

Master 2nde année

MENTION SCIENCES POUR L'ENVIRONNEMENT - BGAE

SPECIALITE BIODIVERSITE DES INTERACTIONS MICROBIENNES ET
PARASITAIRES

PARCOURS SAEPS

SANTÉ ANIMALE ET ÉPIDÉMIOLOGIE
DANS LES PAYS DU SUD

RAPPORT DE STAGE

**Influence des escargots d'eau (*Pomacea canaliculata*)
sur la persistance du virus H5N1 dans
l'environnement**

Présenté par

Daniel GONZALEZ

Réalisé sous la direction du Dr Marc SOURIS

Organisme et pays : IRD (UMR 190)- Thaïlande

Période du stage : avril - septembre 2010

Date de soutenance : 16 septembre 2010

Membres du jury : Catherine MOULIA et Flavie GOUTARD

Année universitaire 2009-2010



Résumé

La grippe aviaire à H5N1 a causé de nombreuses épidémies à partir de 2004 en Asie du Sud-est. La Thaïlande, l'un des plus gros producteurs de volailles dans le monde, a été sévèrement touchée par ces différentes épidémies. Le pays est actuellement considéré comme indemne de grippe aviaire. Néanmoins, on sait que le virus est présent en Thaïlande sans savoir où il persiste exactement. C'est dans ce contexte que ce projet a été mis en place afin d'essayer de comprendre l'émergence répétée du virus et des causes non résolues de ces émergences.

On s'est intéressé à une espèce d'escargot appartenant à la famille des Ampullariidae, *Pomacea canaliculata*. Cet escargot, introduit d'Amérique du Sud dans les années 80, est devenue une espèce invasive dans tout le pays grâce à sa très bonne capacité d'adaptation à divers types de milieux. Ce projet a pour but de vérifier si cette espèce peut être considérée comme un réservoir potentiel du virus H5N1 de la grippe aviaire. On sait également que cette espèce possède dans son mucus, les acides sialiques permettant la fixation du virus chez les mammifères. Pour l'étude on a infecté expérimentalement plusieurs escargots, élevés en aquarium pendant 3 mois, avec du virus H5N1. On a ajouté, en conditions P3, une solution virale de souche asiatique dans deux bacs contenant de l'eau seule et deux bacs, de l'eau avec des ampullaires, à une température proche de 30 °C (conditions naturelles). Des prélèvements d'eau et d'escargots ont été effectués tous les deux jours. L'analyse a porté sur l'eau et les organes des ampullaires. La mise en culture s'est faite sur œufs embryonnés de poules et le test diagnostique par hémagglutination. Cette méthode a permis de détecter la présence du virus dans l'eau et l'escargot. On a également effectué une RT-PCR quantitative sur les échantillons d'escargots afin de calculer la concentration virale de départ.

Le virus a été détecté jusqu'à 12 jours après infection dans les bacs ne contenant que de l'eau (bacs 1 et 2) et 14 jours dans l'eau des bacs contenant les escargots (bacs 2 et 3). 16 échantillons d'escargots sur 35 ont donné un résultat positif au test HA et le virus a été trouvé jusqu'à 11 jours après infection. Concernant les qRT-PCR, on a pu déterminer la concentration en virus H5N1 pour 14 escargots sur 25. La concentration virale chez les mollusques est plus importante après 5 jours d'infection comme le montre les résultats PCR. Les deux techniques donnent des diagnostics cohérents l'une de l'autre.

Les escargots semblent avoir la capacité d'héberger le virus mais sans nécessairement le multiplier. Ces mollusques ont besoin d'un laps de temps afin de capter et concentrer le virus dans leur organisme. D'autres études complémentaires pourraient permettre de localiser le virus parmi les différents organes (intestin, poumon, branchie...).

Mots-clefs : virus H5N1, *Pomacea canaliculata*, persistance, test d'hémagglutination, culture sur œufs embryonnés, qRT-PCR et Thaïlande

Abstract

The avian flu by H5N1 had produced several outbreaks since 2004 Southeast Asia. Thailand, one of the most important poultry producers in the world, was affected by these outbreaks. The status country is considered as unharmed of avian flu. Nevertheless, it knows that virus is still present in Thailand but nobody knows where exactly. It is in this overall context that this project was carried out in order to understand continuous emergence of virus and their undetermined cause.

We interested about a species of snails, *Pomacea canaliculata* which belongs to Ampullariidae family. This snail, introduced from South America in 80s, became an invasive species thanks to its very efficient adaptability to different ecosystems. The aim of this project is verify if this species can be considered as a potential host of H5N1 strain. Moreover, we know that apple snails own in their mucus, sialic acids allowing the virus fixation on mammal cells. For this study, we infected several snails, bred in tanks for 3 months, by H5N1 strain. We added, in BSL3 conditions, an Asian strain viral solution in two tubs with only water and two tubs with water and snails, at 30 °C (natural conditions). Sampling of water and snails were made every two days. The analysis concerned to water and snails' organs. The culture assay was achieved on chicken embryonated eggs and diagnostic test by hemagglutination. This method let the detection of virus particles in water and snails.

The virus was detected until 12 days after infection in tub containing only water and 14 days in water of tubs containing snails. 16 snails' samples among 35 gave a positive diagnostic with HA test and the virus was found until 11 days after infection. About qRT-PCR, we have determined the H5N1 concentration of 14 snails among 25. Virus concentration on snails is higher after 5 days of infection as it shown by PCR results. Both techniques (HA test and qRT-PCR) give coherent results.

Snails seem to have ability to carry virus but not necessarily to be a potential host of H5N1 virus. This animal needs a period of time to catch and concentrate the virus in his organism. More techniques (immunofluorescence technique) could be used to locate the virus on positives snails' organs (gill, lung, intestine).

Keywords : H5N1 virus, *Pomacea canaliculata*, persistence, hemagglutination test, embryonated eggs culture, qRT-PCR and Thailand

Sommaire

Résumé.....	1
Abstract	2
Sommaire.....	3
Remerciements.....	4
I. Introduction.....	5
II. Matériel et méthodes.....	12
1. Matériel.....	12
1. 1. Le virus	12
1. 2. Les escargots.....	12
2. Méthodes.....	16
2. 1. Infection	17
2. 2. Prélèvement des échantillons	18
2. 3. Mise en culture sur œufs embryonnés.....	19
2. 4. Test de sensibilité	22
2. 5. Tests diagnostics du virus.....	26
2. 5. 1 Test d'hémagglutination (HA).....	26
2. 5. 2 RT-PCR quantitative	27
III. Résultats	28
1. Test d'hémagglutination	28
1. 1. Persistance du virus dans l'eau sans escargots (bacs B1 et B4).....	29
1. 2. Persistance du virus dans l'eau avec escargots (bacs B2 et B3).....	31
1. 3. Persistance du virus chez les escargots (bacs B2 et B3).....	33
2. RT-PCR quantitative.....	34
IV. Discussion.....	36
1. Persistance du virus dans l'eau	37
2. Persistance du virus dans les escargots.....	38
V. Conclusion et perspectives.....	39
Bibliographie.....	41
Annexes.....	45

Remerciements

Il y a tellement de personnes que j'aimerais remercier pour toute l'aide et soutien apportés au cours de ces 5 mois passés ici en Thaïlande.

Je tiens tout d'abord à remercier particulièrement Marc, mon maître de stage, pour sa gentillesse, patience et également soutien au cours de toutes les péripéties diverses et variées qui me sont arrivées. J'ai aimé le dialogue et la communication qu'il y a eu au cours de ce stage. Je tiens également à remercier l'équipe de l'IRD en Thaïlande dans son ensemble mais surtout Régine et Khruawan de m'avoir accueilli au sein de leur organisme de recherche.

Je souhaite également remercier toute l'équipe du CVVD de m'avoir accueilli pour le début de mon stage. Un grand merci au Docteur PATTAMAPORN ainsi qu'à toute l'équipe du CVVD : Nok, Ploy, Pa, Peul, Off, Ko et Eva. Merci pour tous ces bons moments passés en votre compagnie, les différentes sorties et parties de rigolade, votre gentillesse et amitié. Je ne vous oublierai jamais ! Merci également à Meriadeg qui m'a aidé à peaufiner mes manipulations lors de sa venue à Bangkok.

Un merci tout particulier à Lina et Pae les deux étudiantes Thaïes qui m'ont aidé à m'installer au cours de mes premiers jours à Bangkok. On se revoit dans un mois ☺

Je tiens également à exprimer ma reconnaissance et gratitude envers l'équipe de la Faculté Vétérinaire et surtout envers les Docteurs Witthawat, Kridsada et Kamlang qui m'ont accueilli au sein de leur unité, alors que ce n'était pas du tout prévu au départ. Un grand merci pour m'avoir enseigné à travailler en P3 et appris des techniques nouvelles. Merci de m'avoir laissé une grande liberté d'action et d'avoir pu mener mon expérience jusqu'à son terme. Je souhaite remercier toutes les personnes qui m'ont aidé (de près ou de loin) au cours de mes manipulations, merci à Bee, Boo, Jitty, Nam'oy... Désolé si j'oublie des gens mais je ne connais pas tous les noms☺. Merci pour votre patience et disponibilité jusqu'à tard le soir et les weekends. Je vous suis extrêmement reconnaissant.

Merci également à l'équipe de Lyon qui m'a accueilli avant mon départ en stage pour me donner de précieux conseils, merci à Madame OTTMANN, ainsi qu'à Amélie GAUTIER avec qui j'ai communiqué tout au long de mon stage afin d'avoir des informations sur l'expérience mise en place en France.

Je tiens à exprimer ma gratitude envers Mr POINTIER et Mr GUÉRIN qui ont répondu à mes questions.

Je souhaite remercier mes amis Français et Thaïlandais pour tous les bons moments passés en votre compagnie, merci à Émilie, Elsa, Ghislain, Cyrille, Arm, Aor, Linda, Nuttee

Je veux remercier également les personnes travaillant dans ma résidence qui ont été d'une extrême gentillesse avec moi (surtout pendant la période des émeutes).

Une mention spéciale à ma famille qui est venue me rendre visite pendant l'été. Merci à ma maman, mon papa et mon frère. Chacun m'a soutenu et aidé dans des moments difficiles. J'ai aimé partager ces moments avec vous.

En dernier lieu je tiens à remercier Charlotte pour son soutien inconditionnel de chaque instant, son aide et sa bienveillance à mon égard.

Un grand merci à toutes ces personnes qui ont participé (de près ou de loin) à ce que mon séjour ici, reste inoubliable.

I. Introduction

Après l'épidémie de 1997 à Hong-Kong, le virus Influenza aviaire H5N1 est réapparu à partir de 2003 en Asie et s'est ensuite largement répandu en Afrique et en Europe. Depuis les importantes épidémies de 2004 et 2005, il réapparaît régulièrement dans de nombreux pays sans que les causes et les mécanismes de ces réémergences soient encore bien compris. Suite aux différentes épidémies de H5N1, 175 millions de volailles ont été abattues en Asie du Sud-est (Burgos *et al.*, 2008). Maintenant endémique dans certaines régions (par exemple en Indonésie et en Égypte), il représente toujours un danger majeur pour la santé animale et humaine. Les épisodes successifs d'émergence et de réémergence des épizooties dues à H5N1 après une période silencieuse soulèvent de nombreuses interrogations. Les oiseaux aquatiques migrateurs ansériformes sont des porteurs asymptomatiques. Ils constituent un réservoir de virus et contribuent à sa propagation aux animaux d'élevage et dans la progression de l'épizootie vers d'autres régions du monde. Cependant, des cas d'infection par H5N1 ont été constatés chez des volailles d'élevages hors périodes migratoires, et l'implication des oiseaux migrateurs dans la contamination ne suffit donc pas à expliquer les épisodes successifs d'émergence et de réémergence du virus H5N1. Il paraît légitime d'envisager que les zones de résidence des oiseaux contaminés peuvent générer des réservoirs «secondaires» tant au niveau de l'eau, du sol et des sédiments que des animaux aquatiques même si les conditions de sa persistance dans l'environnement sont encore mal connues.

La Thaïlande, d'une superficie de 514 000 km² (similaire à la France), est un pays d'Asie du Sud-est dont la capitale est Bangkok. En 2009 la population était de 67 millions d'habitants, selon une estimation du *Thailand National Statistic Office* (<http://web.nso.go.th/>). En 2008, 68 % de la population vivait en zone rurale (Burgos *et al.*, 2008). On peut considérer qu'actuellement ce chiffre est moins important mais que la grande majorité de la population réside toujours à la campagne. Les zones les plus habitées sont essentiellement les plaines du centre et du nord du pays qui correspondent également aux zones des rizières. Même si l'agriculture ne représente que 10 % du PIB global (Burgos *et al.*, 2008), ce secteur joue un rôle primordial dans l'économie du pays. En effet, il emploie 40 % de la population active du pays (Burgos *et al.*, 2008). La production de riz est le moteur du secteur agricole puisque le pays en est le 1^{er} exportateur au niveau mondial.

Le pays possède des frontières terrestres avec la Birmanie (1 800 km), le Laos (1 754 km), le Cambodge (803 km) et la Malaisie (506 km) (<http://www.statistiques-mondiales.com/thaïlande.htm>). Au total, la Thaïlande partage 4 863 km de frontières avec ses pays voisins. (Fig. 1). Il existe de nombreux passages de frontières entre ces différents pays, ce qui conduit à de nombreux échanges formels et informels, au niveau des animaux et de leurs produits. La grippe aviaire ayant déjà sévit dans ces cinq pays (depuis la première épidémie de 2004), le risque d'échanges de matières contaminées est bien réel. Le contexte sanitaire reste donc toujours précaire (Fig. 2).

Le premier cas de grippe aviaire a été recensé en Thaïlande en 2004 (Burgos *et al.*, 2008). Jusqu'à janvier 2007 il y a eu 1 929 foyers de H5N1 hautement pathogène (Annexe 1). Au total il y a eu entre 2004 et 2007, 4 épidémies majeures de H5N1. La plus importante a été celle de juillet 2004 à avril 2005. Plus de 64 millions de volailles ont été abattues au cours de ces différentes épidémies de grippes aviaires (Burgos *et al.*, 2008 ; Heft-Neal *et al.*, 2009). La plupart des foyers ont été localisés dans la plaine centrale de Thaïlande, endroit même où sont

concentrées la grande majorité des rizières. Néanmoins, on a pu observer des foyers un peu partout dans tout le pays.



Figure 1 : Carte politique de la Thaïlande (d'après <http://www.e-voyageur.com/images/carte/carte-thaïlande.jpg>).



Figure 2 : Présence de cas avérés de grippe aviaire au sein de volailles domestiques depuis 2003 en Asie du Sud-est (d'après http://post.cloudfront.goodinc.com/wp-content/uploads/2009/01/avian_flu.jpg).

La production de volailles est devenue l'un des points forts de l'agriculture et plus généralement, de l'industrie thaïlandaise. À l'origine la production aviaire était exclusivement une activité propre aux villages et intégrée au système traditionnel des fermes (Teufel *et al.*, 2010). Elle a connu à partir du début des années 1970, un essor considérable, grâce à l'introduction de souches pondeuses provenant des pays industrialisés et au début de la commercialisation de poulets de chair. Elle a également mis en place un système moderne d'abattoir afin de procéder à la transformation des volailles en poulet congelé pour le marché de l'exportation (Tisdell *et al.*, 1997). Entre 1984 et 1995, le nombre de poules a augmenté de 73 % (Riethmuller et Chalermmpao, 2002). À cette même époque, de nombreuses grosses compagnies privées ont vu le jour. Au fil des années, le secteur s'est intensifié, modernisé et structuré avec l'implantation de gros élevages industriels destinés à la commercialisation et l'exportation. Actuellement, l'essentiel de la production aviaire est assuré par les grosses firmes de production ou multinationales. La production de volailles s'est transformée en secteur commercial spécialisé, hors de l'exploitation agricole, dans des unités spécialisées de type industriel.

La production avicole comprend plusieurs types de production : poulets de chair, poules pondeuses, canards de chair, canes pondeuses et oies. En 2007, il y avait 280 millions de poules, 25 millions de canards et 5 millions de cailles en Thaïlande (Department of Livestock Development MAC 2008). Actuellement, la Thaïlande est l'un des plus gros producteurs (7^e position en 2003) et exportateurs (5^e position en 2007) de volailles dans le monde. Le pays a produit plus de 800 millions de poulets de chair en 2006 (Department of Livestock Development MAC 2008). Pour ce qui est de la production et des exportations de canards, elle arrive en 3^e et 4^e position respectivement (Boloh, 2008).

La grippe aviaire ou influenza aviaire est une maladie contagieuse, causée par un ensemble de virus à ARN de la famille des Orthomyxoviridae et placés dans le genre *Influenzavirus* de type A (Fig. 3). Cette maladie touche de nombreuses espèces d'oiseaux sauvages ou domestiques. Ces virus peuvent également toucher l'homme et d'autres mammifères comme le porc.

La classification des virus grippaux s'appuie sur les propriétés antigéniques de l'hémagglutinine (H) et de la neuraminidase (N) qui sont deux protéines de surface du virus. Actuellement, 16 sous-types H (H1-H16) et 9 sous-types N (N1-N9) ont été identifiés (World Health Organization Expert Committee, 1980). Les récepteurs du virus Influenza A sont constitués d'un acide sialique relié à un galactose d'une glycoprotéine ou d'un glycolipide de la membrane plasmique de la cellule hôte. Les acides sialiques (du grec sialos : 'salive') sont des dérivés d'un monosaccharide à dix atomes de carbone, et regroupent plus de 40 dérivés naturels d'acide neuraminique. Ils peuvent aussi bien représenter l'acide N-acétylneuraminique (présent chez l'être humain) que toute une série de substances apparentées à cet acide chez d'autres organismes. Ces acides sont situés sur la membrane cellulaire, ils sont impliqués dans de nombreux processus de reconnaissance et d'adhésion cellulaire (Bürgmayr *et al.*, 2001). Les acides sialiques impliqués dans l'infection par un virus Influenza A sont de deux types (acide N-acétylneuraminique [NeuAc] ou acide N-glycolylneuraminique [NeuGc]) et utilisent deux types de liaisons osidiques entre l'acide sialique et le galactose (liaison α 2,3 et liaison α 2,6) (Shinya *et al.*, 2006). La structure de l'hémagglutinine du virus Influenza (HA) impose les caractéristiques de l'acide sialique récepteur. La spécificité d'espèce des virus Influenza est directement liée à la présence sur les cellules hôtes des acides sialiques possédant ces caractéristiques. Les HA des virus aviaires se lient de préférence aux acides sialiques de type NeuGc avec liaison α 2,3. Ces acides sialiques sont en général présents sur les cellules aviaires au niveau du tractus digestif

(<http://www.virology.ws/2009/05/05/influenza-virus-attachment-to-cells-role-of-different-sialic-acids/>).

Ce virus est segmenté avec plusieurs brins d'ARN ce qui favorise les nombreuses mutations caractéristiques des virus influenza. À ce jour, les virus influenza A hautement pathogènes qui induisent des signes cliniques aigus chez le poulet et la dinde, ont été associés avec les seuls sous-types H5 et H7. Toutes les souches H5 et H7 ne sont pas forcément virulentes. Néanmoins, il est possible qu'une souche non pathogène devienne hautement pathogène après mutation (Manuel terrestre de l'OIE, 2005).

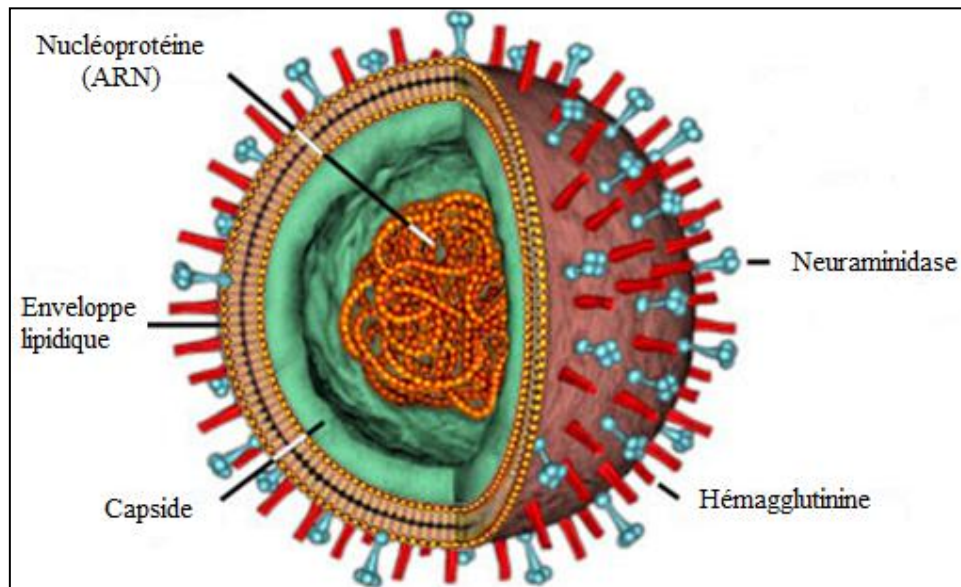


Figure 3 : Structure d'un virus Influenza (d'après <http://micro.magnet.fsu.edu/cells/viruses/images/influenzafigure1.jpg>).

Chez un poulet atteint de grippe aviaire, les signes cliniques peuvent être très variés : larmolement excessif, détresse respiratoire, sinusite, œdème de la tête et de la face, cyanose sur les parties cutanées non emplumées et diarrhée. Une mort brutale peut être le seul symptôme. Les symptômes peuvent varier énormément en fonction de l'hôte, de l'âge de l'oiseau, de la présence d'autres microorganismes et des conditions environnementales (Manuel terrestre de l'OIE, 2005).

Les canards et les oiseaux sauvages sont la plupart du temps asymptomatiques ce qui rend difficile la détection de cas cliniques. Les signes cliniques chez ces espèces là, sont dus à des souches de virus influenza A faiblement pathogènes (IAFP). Lorsqu'ils sont transmis à des oiseaux d'élevage, ces virus IAFP ont une grande variabilité dans l'expression de leur pouvoir pathogène. Dans certaines circonstances, ils provoquent des épidémies massives dans les élevages, entraînant progressivement une modification de la souche IAFP en un virus plus pathogène. En cas d'absence de contrôle, le virus peut alors se transformer en une souche hautement pathogène (IAHP) comme c'est le cas de H5N1, qui se caractérise par l'apparition brutale d'une maladie grave, une contagion rapide et un taux de mortalité qui peut avoisiner les 100 % en 48 heures.

Chez l'homme, le virus H5N1 hautement pathogène représente une menace réelle car il est capable de franchir la barrière entre espèces pour infecter des humains. Ceci est dû à deux mécanismes. Tout d'abord, un réassortiment du matériel génétique entre les virus

humains et aviaires au cours de la co-infection d'un sujet humain ou d'un porc. Enfin, le virus a la capacité du virus à se fixer aux cellules humaines. Tous les cas humains ont coïncidé avec des flambées de grippe aviaire H5N1 hautement pathogène dans les populations de volailles. Le tableau clinique est composé d'une forte fièvre et d'un syndrome grippal. Il peut y avoir présence également de diarrhées, vomissements, douleurs abdominales, thoraciques et saignements du nez et des gencives pour certains patients. Certains cas humains n'ont pas présenté de symptômes respiratoires. Tous les cas humains ont été détectés en Asie (91 cas dont 41 décès au Vietnam, 17 cas dont 12 décès en Thaïlande, 5 cas dont 3 décès en Indonésie et 4 cas dont 4 décès au Cambodge)

(http://www.who.int/mediacentre/factsheets/avian_influenza/fr/index.html#humans).

À l'heure actuelle, la lutte contre l'agent infectieux de la grippe aviaire se limite essentiellement à des mesures draconiennes de prophylaxie sanitaire. Ces mesures impliquent, pour un élevage infecté, l'abattage de toutes les volailles domestiques associé à une restriction de la circulation des animaux. Bien que nécessaires, ces mesures ne peuvent être mises en place qu'après diagnostic des premiers cas. Les données épidémiologiques concernant les épizooties à influenza hautement pathogène H5N1 observées en 1997 et depuis 2003 ont cependant montré que ces mesures sont insuffisantes pour empêcher la dissémination du virus non seulement dans les zones d'émergence en Asie du Sud-est. Une meilleure connaissance de l'écologie du virus et de ses modes de diffusion permettrait de mettre en place des plans de surveillance, d'alerte ou de contrôle afin d'agir en amont des mesures sanitaires traditionnellement utilisées.

En Thaïlande, les escargots aquatiques de type *Pomacea canaliculata* (golden apple snail), de la famille des Ampullariidae, sont très présents dans les zones lacustres ou humides (rizières, mares...) qui sont également visitées par de nombreux oiseaux. Ils causent de nombreux ravages au sein des champs de riz car abîme les jeunes pousses (Kenji, 2003). Ils fournissent aux oiseaux sauvages (par ex les cigognes) et domestiques (notamment les canards en divagation) une nourriture abondante (Cowie, 2006). Ces oiseaux, notamment les cigognes, ont été largement victimes de l'influenza aviaire lors des épidémies qui ont touchées la Thaïlande en 2004 et 2005 (Auewarakul, 2008). Corrélation entre épidémie de grippe aviaire et présence de canard de libre parcours a également été démontrée en Thaïlande (Gilbert *et al.*, 2006 ; Gilbert *et al.*, 2007). Il existe un contact étroit entre ces différentes espèces (Fig. 4). Le rôle épidémiologique joué par les escargots peut donc s'avérer essentiel car cet animal est un maillon essentiel dans l'écosystème des rizières et zones lacustres de Thaïlande.



Figure 4 : Contact étroit entre les oiseaux et les escargots dans la nature.

L'intérêt de ce modèle réside dans le fait que cet escargot possède dans son mucus les acides sialiques permettant la fixation des virus influenza aviaire. Ce virus se fixe aux cellules de son hôte au niveau des acides sialiques. D'autres expériences préliminaires ont démontré que les acides sialiques se retrouvaient communément chez certains escargots aquatiques et terrestres, où ils étaient impliqués dans de nombreux processus de reconnaissance et d'adhésion cellulaires (Bürgmayr *et al.*, 2001). Des acides aminés ont été identifiés dans le mucus de plusieurs escargots (*Lymnea trunculata*, *Lymnea palustris* et *Biomphalaria glabrata*) et des acides sialiques dans celui d'*Helisoma trivolvis*. *H. trivolvis* appartient à la famille des Planorbidae qui sont des escargots aquatiques tout comme les ampullaires (Prechel *et al.*, 1976). On a également retrouvé des acides sialiques dans le mucus de la limace, *Arion lusitanicus* (Bürgmayr *et al.*, 2001).

Il est également à souligner que cet escargot peut servir d'hôte intermédiaire ou hôte paraténique (hôte accidentel ou non obligatoire) pour différents parasites. En effet, il a été démontré récemment, que cet escargot pouvait servir de second hôte intermédiaire pour le nématode *Gnathostoma spinigerum*. Ce parasite est la principale cause de gnathostomoses chez l'homme, surtout en Thaïlande. L'infection de l'escargot se fait par les larves L3 (Komalamisra *et al.*, 2009). Cet escargot peut également servir d'hôte pour *Angiostrongylus cantonensis*, un nématode responsable de la méningite éosinophile humaine et *Echinostoma ilocanum*, un cestode responsable de douleurs abdominales et diarrhées (Chobchuenchom et Bhumiratana, 2003 ; Sri-aroon *et al.*, 2005). Cet escargot est donc important d'un point de vue médical car il peut transmettre de nombreuses maladies parasitaires aux populations locales. La transmission de ces différentes zoonoses aux villageois se fait lorsque l'escargot est consommé cru, mal cuit ou sert pour accompagner l'alcool. Ces pratiques se font essentiellement au nord et nord-est du pays.

Avec l'augmentation du réseau hydrographique en Thaïlande, la distribution géographique de l'espèce s'est étendue à toute la Thaïlande. La conséquence de ce phénomène a été l'augmentation du risque de transmission de maladies parasitaires à l'homme (Sri-aroon *et al.*, 2007).

Ce travail s'inscrit dans le cadre du projet de recherche ECOFLU (Virus influenza aviaire dans l'environnement : identification des conditions l'émergence et de persistance pour l'amélioration des réseaux de surveillance) financé par l'ANR.

Un travail similaire a déjà été fait à l'Université Lyon I et l'École Nationale Vétérinaire de Lyon, à partir d'ampullaires trouvés dans les Dombes. Ce stage s'est donc fait en collaboration et en s'inspirant des techniques utilisées en France.

Le stage s'est déroulé à la fois au CVVD (Center for Vector and Vector Borne Diseases) de la Faculté de Sciences de Mahidol pour la mise en place de l'élevage d'ampullaires et la partie bibliographique, et également à la Faculté Vétérinaire de Mahidol pour les expériences avec le virus H5N1. Ce stage a eu lieu dans la province de Nakhon Pathom (30 km à l'ouest de Bangkok). Cette province a été gravement touchée par les différentes épidémies de grippe aviaire avec de nombreux abattages de volailles.

Elle se caractérise par une forte production avicole avec plusieurs élevages de canards et de poules (209 fermes recensées dans toute la province pour environ 3 millions de volailles d'après les enquêtes de terrain menées par les deux étudiantes thaïes de Mahidol), ainsi que de nombreux champs de riz. Ces champs sont des zones de divagation pour les canards en libre parcours et les oiseaux migrateurs qui viennent se nourrir dans les champs de riz (Fig. 5).



Figures 5 : Canards en libre parcours dans la province de Nakhon Pathom (centre de la Thaïlande).

Les conditions de persistance du virus Influenza A dans l'eau ont fait l'objet de nombreuses études (Ito *et al.*, 1995 ; Brown *et al.*, 2006 ; Stallknecht et Brown, 2009). D'après la littérature, le virus Influenza peut persister dans l'eau de quelques jours à plusieurs mois, en fonction principalement de la souche virale, la température et des conditions physico-chimiques de l'eau (salinité, pH...). Par exemple, à 17 °C, certaines souches peuvent survivre et rester infectieuses pendant 207 jours (Ito *et al.*, 1995). La survie du virus dans l'eau est inversement proportionnelle à la température et salinité (Brown *et al.*, 2006). Ainsi, à une température proche de 30 °C (conditions rencontrées en Thaïlande), la persistance d'un virus Influenza aviaire n'est que de quelques jours (Stallknecht et Brown, 2009). L'objectif de ce travail est de mesurer l'influence des escargots d'eau douce dans la concentration et la persistance du virus H5N1 dans l'eau, dans des conditions physiques proches des conditions environnementales de la Thaïlande (chaleur et humidité, conditions en principe peu favorables à la persistance du virus Influenza). On souhaite ainsi répondre à plusieurs questions : les escargots d'eau douce ont-ils une influence significative sur la persistance du virus dans l'eau (favorable ou défavorable) ; le virus se concentre-t-il dans les escargots, et, si tel est le cas, sa persistance est-elle modifiée ? Le virus peut-il infecter les escargots ? Pour mener cette

expérience, des escargots de la famille des Ampullariidae à partir d'œufs récoltés dans l'environnement (province de Nakhon Pathom, Thaïlande). On a ensuite déposé du virus H5N1 (à une concentration correspondant à une fiente de canard) à la fois dans un récipient contenant de l'eau sans escargot et dans deux récipients contenant de l'eau avec des escargots, les autres paramètres étant identiques. La présence et la concentration du virus H5N1 dans l'eau et dans les escargots ont été testées, en prélevant de l'eau et des ampullaires dans chaque récipient, tous les jours jusqu'à preuve de la disparition du virus vivant.

II. Matériel et méthodes

Cette expérience fait intervenir le pathogène (virus H5N1) et les escargots aquatiques de type Ampullariidae, très communs en Thaïlande. Elle a été préparée au sein de la Faculté des Sciences de l'Université Mahidol (campus Salaya) et s'est déroulée au sein du Laboratoire de la Faculté Vétérinaire de l'Université Mahidol, en condition P3 animal. L'expérience consiste à infecter avec du virus H5N1 de l'eau avec présence d'escargots et de l'eau ne contenant pas d'escargots, afin de comparer la persistance du virus dans ces deux situations et de vérifier si les escargots peuvent favoriser la persistance, concentrer le virus, ou même être infecté.

1. Matériel

1. 1. Le virus

Le virus utilisé est un virus Influenza de type H5N1 qui provient de la souche thaïlandaise A/Chicken/Thailand/VSMU-3-BKK/2004. Cet isolat, très virulent chez les oiseaux d'élevage, a été séquencé par le laboratoire de la Faculté Vétérinaire. La solution virale a été fournie et préparée par le laboratoire de la Faculté Vétérinaire. Le titre d'origine a été déterminé par culture cellulaire (cellules MDCK). La production de virus en plus grande quantité a été effectuée par mise en culture sur œufs embryonnés. Le titre final de $2,14 \times 10^6$ particules virales par mL a été établi à nouveau par culture cellulaire.

1. 2. Les escargots

Le modèle animal étudié au cours de ce stage est une espèce invasive d'escargot d'eau douce appelée *Pomacea canaliculata* (Fig. 6). Il s'agit d'un Mollusque Gastéropode de l'ordre des Architaenioglossa et appartenant à la famille des Ampullariidae. Les Architaenioglossa ont la caractéristique d'avoir un opercule (Pr. Pointier, Université Perpignan). Ce mollusque, communément appelé « Golden apple snail », est un escargot amphibie car il possède, à la fois une branchie (cténidies) et un pseudo-poumon ce qui lui permet de vivre dans l'eau et hors de l'eau (Joshi, 2005). Cet escargot est herbivore mais en l'absence de nourriture, il peut devenir cannibale ou se contenter de cadavres d'animaux (Estebenet et Martín, 2002 ; Chobchuenchom et Bhumiratana, 2003 ; Joshi, 2005 ; Joshi, 2007). Ils sont particulièrement nombreux aux abords des habitations, car ils se nourrissent également des déchets. Ils sont présents même dans l'eau polluée ou souillée. L'espèce est

gonochorique à savoir que les individus sont de sexes séparés (Kenji, 2003 ; Estebenet et Martín, 2002). Cette espèce se caractérise par sa grande taille (la coquille pouvant atteindre 80 mm chez certaines femelles) et les femelles sont plus grandes généralement que les mâles (Carlsson *et al.*, 2004 ; Estebenet et Martín, 2002). Cet escargot a un taux élevé de reproduction, une faculté à s'adapter à tout type de milieu et à des conditions difficiles, un appétit vorace et une compétitivité supérieure à celle des espèces natives d'escargots (Joshi, 2005). Il existe un dimorphisme sexuel entre mâles et femelles avec des caractères sexuels secondaires différents comme la taille de la coquille, la forme et le poids (Estebenet et Martín, 2002). Leur longévité peut atteindre 4 ans (Joshi, 2005). La croissance et la fécondité de l'escargot dépendent de plusieurs facteurs tels que la densité populationnelle, la disponibilité en ressources et la température (Estebenet et Martín, 2002). Cette espèce, originaire d'Amérique du Sud, a été introduite à Taïwan dans les années 1980 afin de lancer une production commerciale pour la consommation humaine, dans les pays d'Asie du Sud-Est (Teo, 2004). La présence en Thaïlande de *Pomacea canaliculata* a été notifiée pour la première fois en 1982. Elle a été considérée comme espèce envahissante à partir de 1988 (Joshi, 2005). D'autres facteurs expliquent l'intérêt suscité par cette espèce et son importation. En effet, la production d'escargots était censée augmenter les revenus des fermiers ainsi que leurs apports en protéines. De plus, ces animaux pouvaient servir de mascottes en étant vendues dans des animaleries (Joshi, 2007). Malheureusement, le projet n'a pas convaincu puisque la demande s'est avérée trop faible. En effet, peu de consommateurs ont été convaincus par le goût de ces escargots (Tanaka *et al.*, 1999 ; Joshi, 2005). Les fermes d'élevage ont été laissées à l'abandon et de nombreux spécimens se sont échappés. Un autre élément à prendre en considération est l'augmentation des réseaux hydrographiques en Thaïlande au cours de ces dernières années. Plusieurs projets ont conduit à la construction de barrages et l'augmentation des systèmes d'irrigation pour la production agricole. Cet effet a eu pour conséquence une hausse des populations d'escargots (Sri-aroon *et al.*, 2007). Ces différents facteurs ont contribué à la dissémination de l'espèce dans l'environnement, puis par la suite à son invasion. En 2001, la répartition de cet escargot s'étendait à plus de 43 provinces, sur 141 257 ha (Joshi, 2007). Leur densité est néanmoins difficile à évaluer, mais il est courant de trouver plusieurs animaux par mètre carré. D'après une étude réalisée sur *Pomacea canaliculata*, on retrouve 2 à 4 individus par m² dans des conditions où l'espèce n'est pas considérée comme envahissante (Ichinose *et al.*, 2000). On peut donc supposer qu'en Thaïlande cette densité est supérieure car l'espèce est invasive. Les escargots déposent leurs œufs en grande quantité sur la végétation hors de l'eau, sous forme de grappes roses très caractéristiques.



Figure 6 : *Pomacea canaliculata*.

Pour l'étude, on a mis au point un élevage d'escargots afin d'avoir un effectif important d'adultes de caractéristiques connues (âge, espèce, mortalité...). Cela a permis de standardiser les données afin d'avoir des individus nés et élevés dans les mêmes conditions. De plus, élever des escargots plutôt que de les prélever adultes dans l'environnement a permis de diminuer la probabilité de présence d'un autre micro-organisme qui pourrait intervenir dans le processus de persistance du virus H5N1. En outre, cela a garanti d'avoir la certitude que les adultes obtenus étaient indemnes de virus H5N1. Les escargots adultes présents dans l'environnement auraient pu, déjà être contaminés par ce virus.

Cet élevage a été mis en place au CVVD (Center for Vector and Vector Borne Diseases) de la Faculté des Sciences à l'Université Mahidol. Deux étudiantes thaïes, sont allées prélever une centaine d'œufs de *Pomacea canaliculata* (Fig. 7 A) sur deux sites différents. Le premier site est le campus de l'Université situé à Salaya (30 km de Bangkok à l'ouest, province de Nakhon Pathom). Il y a de nombreux petits cours d'eau avec une présence importante d'escargots. Le deuxième site quant à lui, se situe dans un petit ruisseau séparé d'un champ de riz par une route (Nakhon Pathom). Dans ce champ de riz il y a présence d'un élevage de canards en divagation. La collecte des œufs s'est faite avant le début du stage car ces escargots ont un cycle de développement assez long (3 mois environ) (http://www.applesnail.net/pestalert/management_guide/pest_management.php).

Il y a eu deux phases de collecte différentes. Ces prélèvements ont été effectués les 30 mars et 27 avril 2010. Les œufs ont été placés dans 5 aquariums différents (50 x 25 x 32 cm) contenant de l'eau (15 cm de profondeur). La température de l'eau a été fixée à 29 °C ce qui est proche des conditions naturelles, entre 27 et 35 °C en fonction du moment de la journée et de la profondeur (Teo, 2004). Le fond a été tapissé de pierres, graviers et sable. Une pompe a permis l'oxygénation de l'eau afin de favoriser la mise en place de l'écosystème et l'élimination des déchets. Les aquariums ont été placés à l'écart des salles de manipulation à température ambiante (sans climatisation). Les œufs, de couleur rose (attachés à une tige végétale également prélevée), ont été placés au dessus de l'eau (Fig. 7 B). Au bout de quelques jours (2 à 6 jours), les œufs ont séché (Fig. 7 C) puis sont tombés à l'eau (Fig. 7 D) où ils ont éclos pour donner de nombreux juvéniles. Ces escargots ont été nourris avec de la salade verte et de la nourriture pour poissons. La mortalité s'est avérée importante dans les premiers jours avant de se stabiliser rapidement. Au bout de trois mois d'élevage, les

escargots ont atteint une taille adulte (1 à 3 cm). Un comptage régulier a été effectué à partir du 2^e mois afin de vérifier la mortalité (Tableau 1). On observe des erreurs de comptage qui s'expliquent par la difficulté à repérer tous les escargots dans un même aquarium. Les escargots morts ont été retirés.



Figures 7 : Mise en place de l'élevage de *Pomacea canaliculata* dans les aquariums.

Tableau 1 : Comptage des escargots.

Comptage	Date	Aquariums					total
		1	2	3	4	5	
1	21/06/10	106	93	93	88	82	462
2	25/06/10	95	76	87	69	80	407
3	29/06/10	88	72	87	61	81	389
4	02/07/10	98	73	86	59	79	395
5	06/07/10	90	72	85	54	73	374
6	11/07/10	79	70	81	60	59	349
7	16/07/10	77	59	81	60	68	345
8	21/07/10	72	60	83	57	68	340
9	23/07/10	72	60	83	59	63	337
10	09/08/10	63	46	68	48	53	278
11	13/08/10	63	52	62	51	47	275

2. Méthodes

L'infection des escargots s'est faite au sein d'une animalerie infectieuse de niveau 3. Quatre récipients en plastiques, appelés B1, B2, B3 et B4 (Fig. 8), de dimensions 39 x 27 x 18 cm, ont été disposés dans un isolateur à volailles (Fig. 9). La préparation des bacs s'est faite une semaine avant le début de l'expérience afin de mettre en place les conditions abiotiques. Chaque récipient a été rempli avec 10 L d'eau. Des pierres et du gravier ont également été ajoutés, ainsi que des coquilles d'œuf pour un apport en calcium. Des diffuseurs pour oxygéner l'eau ont été installés. Des couvercles en plastique percés de trous ont permis de fermer les récipients. Les bacs 1 et 4 ont servis de témoin tandis que des escargots de l'élevage ont été introduits dans les récipients B2 et B3 (60 par récipient). On a utilisé les escargots les plus gros afin de faciliter la dissection ultérieure des organes. On n'a pas tenu compte de la provenance ni de l'âge des escargots afin de ne pas compliquer l'expérience en incluant d'autres paramètres. La température de l'eau a été fixée à 29°C (grâce à une ampoule), proche des conditions naturelles et a été vérifiée quotidiennement grâce à des thermomètres. Le pH a également été mesuré avec du papier pH. Les escargots ont été nourris avec de la salade verte tous les jours pendant toute la durée de l'expérience. L'eau n'a pas été changée au cours de l'expérience. Pour finir un comptage a été effectué en début et fin d'expérience afin de voir si le virus H5N1 engendrait une mortalité des escargots trop importante.

L'expérience a consisté à infecter ces quatre récipients avec une dose identique de virus H5N1, puis à prélever tous les jours de l'eau et tous les deux jours des escargots afin de détecter la présence du virus vivant. Les escargots ont été disséqués afin de prélever séparément différents organes : branchie, pseudo-poumon, intestin, ainsi que du mucus. Les divers prélèvements ont été mis en culture sur œufs embryonnés, puis testés par hémagglutination pour vérifier la présence de virus vivant. Sur certains échantillons d'origine, une PCR quantitative en temps réel a également été effectuée.



Figure 8 : Préparation des bacs pour l'expérience.



Figures 9 : Mise en place des bacs dans l'isolateur à volailles.

2. 1. Infection

Dans la nature, on estime qu'un canard infecté relâche 10^7 particules virales par mL dans ses fientes (Webster *et al.*, 1978). Le virus peut survivre un mois lorsque les fientes sont émises dans l'eau. Dans les conditions naturelles, la concentration virale dans l'eau après la déjection peut être estimée entre 10^2 et 10^3 DICT₅₀/mL en estimant qu'une fiente (20 à 30 g par jour) infecte entre 100 L (par exemple, dans une rizière) et 1000 L d'eau (dans une mare). La concentration de la solution virale produite par le laboratoire de la Faculté Vétérinaire étant de 2.14×10^6 DICT₅₀/mL, et chaque récipient contenant 10 L d'eau, nous avons introduit 0.5 mL de solution virale dans chaque bac pour obtenir une concentration (10^2 DICT₅₀/mL) correspondant aux conditions naturelles. On parle de DICT₅₀ car il s'agit de la dose infectante 50 % qui correspond à la dilution de virus pour laquelle 50 % des puits présentent une hémagglutination. Le titre du virus était déjà connu car défini au préalable grâce à la culture cellulaire à partir de cellules MDCK. Le bulleur a permis l'homogénéisation du virus dans tout le bac. L'eau n'a pas été changée pendant toute la durée de l'expérience.

2. 2. Prélèvement des échantillons

Deux types de prélèvements ont été effectués. On a tout d'abord prélevé de l'eau dans les quatre bacs, puis ensuite des escargots dans B2 et B3.

Dans chaque bac on a prélevé environ 3 mL d'eau répartis dans deux tubes eppendorf. On a décidé de faire deux aliquotes de chaque échantillon (seul un aliquot a servi aux analyses). L'eau a été prélevée grâce à une seringue à tuberculine de 3 mL. Les prélèvements d'eau et le diagnostic ont été effectués tous les jours.

Dans B2 et B3 on a collecté 5 escargots pour chaque session de prélèvements (deux dans un bac et trois dans l'autre en inversant à chaque session de prélèvements). On a décidé d'avoir cinq répliquats afin d'avoir une représentativité statistique.

On peut estimer le nombre x d'escargot à prélever en fonction du risque (choisi) de ne pas détecter le virus même s'il est présent dans au moins un escargot, de la probabilité p (inconnue) de présence du virus dans l'escargot et de la probabilité u (estimée) de mettre en évidence le virus lorsque le virus est effectivement présent dans le prélèvement (sensibilité du test d'hémagglutination après culture du virus sur œuf de poule embryonné). La probabilité de mettre le virus en évidence en prélevant x escargots est $1 - (1 - pu)^x$. Avec le test d'hémagglutination après culture sur œuf que nous utilisons, on estime u à 0.90. Pour $p=0.2$ et $x=5$, $P = 0.61$. Pour $p=0.6$ et $x=5$, $P = 0.89$. Pour $p=0.8$ et $x=5$, $P = 0.899$, proche de u . En estimant à 0.90 la sensibilité du test d'hémagglutination après culture du virus sur œuf de poule embryonné, la probabilité de ne pas mettre en évidence le virus vivant pendant cinq jours si celui-ci est malgré tout encore présent, est inférieure à 10^{-5} .

Les premiers prélèvements d'eau, correspondant au témoin, ont été effectués avant l'ajout du virus H5N1 pour s'assurer de l'absence de virus dans les bacs. La deuxième session de prélèvements a eu lieu le lendemain de l'infection. Les prélèvements suivants ont eu lieu tous les jours pour l'eau et tous les deux jours pour les escargots. Pour les prélèvements d'eau, chaque identifiant débute par le numéro de bac concerné (B1, B2, B3 ou B4) suivi du numéro de prélèvement. Le prélèvement n°0 correspond au prélèvement témoin juste avant l'ajout de la solution virale. Le prélèvement n°1 a été effectué un jour après l'infection par le virus. L'expérience s'est déroulée sur 15 jours. Le calendrier des prélèvements est présenté dans le Tableau 2.

Tableau 2 : Calendrier des prélèvements.

Prélèvements													
dates	eau								escargots				
03/09/2010	B1 0 (1)	B1 0 (2)	B2 0 (1)	B2 0 (2)	B3 0 (1)	B3 0 (2)	B4 0 (1)	B4 0 (2)					
04/09/2010	B1 1 (1)	B1 1 (2)	B2 1 (1)	B2 1 (2)	B3 1 (1)	B3 1 (2)	B4 1 (1)	B4 1 (2)	E001	E002	E003	E004	E005
05/09/2010	B1 2 (1)	B1 2 (2)	B2 2 (1)	B2 2 (2)	B3 2 (1)	B3 2 (2)	B4 2 (1)	B4 2 (2)					
06/09/2010	B1 3 (1)	B1 3 (2)	B2 3 (1)	B2 3 (2)	B3 3 (1)	B3 3 (2)	B4 3 (1)	B4 3 (2)	E006	E007	E008	E009	E010
07/09/2010	B1 4 (1)	B1 4 (2)	B2 4 (1)	B2 4 (2)	B3 4 (1)	B3 4 (2)	B4 4 (1)	B4 4 (2)					
08/09/2010	B1 5 (1)	B1 5 (2)	B2 5 (1)	B2 5 (2)	B3 5 (1)	B3 5 (2)	B4 5 (1)	B4 5 (2)	E011	E012	E013	E014	E015
09/09/2010	B1 6 (1)	B1 6 (2)	B2 6 (1)	B2 6 (2)	B3 6 (1)	B3 6 (2)	B4 6 (1)	B4 6 (2)					
10/09/2010	B1 7 (1)	B1 7 (2)	B2 7 (1)	B2 7 (2)	B3 7 (1)	B3 7 (2)	B4 7 (1)	B4 7 (2)	E016	E017	E018	E019	E020
11/09/2010	B1 8 (1)	B1 8 (2)	B2 8 (1)	B2 8 (2)	B3 8 (1)	B3 8 (2)	B4 8 (1)	B4 8 (2)					
12/09/2010	B1 9 (1)	B1 9 (2)	B2 9 (1)	B2 9 (2)	B3 9 (1)	B3 9 (2)	B4 9 (1)	B4 9 (2)	E021	E022	E023	E024	E025
13/09/2010	B1 10 (1)	B1 10 (2)	B2 10 (1)	B2 10 (2)	B3 10 (1)	B3 10 (2)	B4 10 (1)	B4 10 (2)					
14/09/2010	B1 11 (1)	B1 11 (2)	B2 11 (1)	B2 11 (2)	B3 11 (1)	B3 11 (2)	B4 11 (1)	B4 11 (2)	E026	E027	E028	E029	E030
15/09/2010	B1 12 (1)	B1 12 (2)	B2 12 (1)	B2 12 (2)	B3 12 (1)	B3 12 (2)	B4 12 (1)	B4 12 (2)					
16/09/2010	B1 13 (1)	B1 13 (2)	B2 13 (1)	B2 13 (2)	B3 13 (1)	B3 13 (2)	B4 13 (1)	B4 13 (2)	E031	E032	E033	E034	E035
17/09/2010	B1 14 (1)	B1 14 (2)	B2 14 (1)	B2 14 (2)	B3 14 (1)	B3 14 (2)	B4 14 (1)	B4 14 (2)					

Une fois les échantillons collectés, ils ont été acheminés dans le laboratoire P3 pour y mener les expériences. Celles-ci ont été effectuées dans une enceinte de sécurité biologique de classe II (communément appelée « bio safety cabinet »).

Pour l'eau, on a centrifugé à 8000 rpm pendant 10 min à 4°C et on a filtré sur membrane 0,45 µm afin d'éliminer les bactéries.

La dissection des organes s'est faite sur les escargots vivants afin de récupérer le maximum de virus (la congélation provoque une baisse du titre du virus). On a décidé de prélever les organes servant à la respiration c'est-à-dire la branchie et le poumon. Ces organes sont faciles à prélever car situés juste en dessous de la coquille. On a également prélevé du mucus grâce à des cotons tiges. Pour finir, on a également prélevé une partie de l'intestin. Une partie des organes a été conservée à -80°C pour d'éventuelles analyses futures. Pour l'expérience elle-même, on a regroupé certains fragments des différents organes d'un même escargot dans un seul tube eppendorf afin de procéder au broyage. On a rajouté 800 µL de PBS à 1X (tampon qui sert à ajuster le pH du virus à 7,2) afin de faciliter le broyage. Ce broyage a été effectué manuellement avec des pilons. On a ensuite fait une centrifugation (8000 rpm, à 4°C pendant 10 min) afin de ne récupérer que le surnageant et fait une filtration sur membrane de 0,45 µm. Les broyats ont ensuite été inoculés dans des œufs embryonnés.

2. 3. Mise en culture sur œufs embryonnés

La production classique d'une souche de virus à influenza aviaire se fait dans des œufs embryonnés. Cette technique a été beaucoup utilisée pour la production de vaccins. Certains articles la déconseillent pour la production de virus H5N1 car le virus peut être létal pour l'œuf (Horimoto et Kawaoka, 2006). Néanmoins, on a décidé d'utiliser cette technique car elle est bien maîtrisée au sein du laboratoire de la Faculté Vétérinaire et qu'elle présente l'avantage d'être très sensible aux virus aviaires (Manual of avian influenza diagnostic techniques, 2006). De plus, le virus se réplique efficacement en utilisant cette technique (Horimoto *et al.*, 2007). Pour toutes ces raisons et d'un point de vue pratique (la culture sur

cellules MDCK étant plus longue et plus compliquée), on a décidé de faire de la culture sur œufs.

L'inoculation s'est faite dans l'allantoïde. Il s'agit de l'organe fœtal qui, chez les oiseaux sert d'appareil respiratoire pour l'embryon et de zone d'élimination des déchets notamment azotés (acide urique). Elle est collée contre la coquille calcaire et abondamment vascularisée ce qui permet les échanges gazeux à travers la coquille poreuse. On a décidé d'inoculer du virus H5N1 dans l'allantoïde car elle est plus grande que l'amnios donc l'inoculation est plus facile. De plus, étant vascularisée, de nombreux échanges ont lieu avec l'embryon ce qui permet la réplication du virus.

Des œufs de poules ont tout d'abord été commandés à l'Université de Kasetsart située au Nord de Bangkok. Ces œufs, fécondés 9 à 11 jours au préalable, proviennent de souches parentales différentes de celles destinées au marché alimentaire. Les œufs sont exempts d'agents pathogènes spécifiques (EAPS) ou indemnes d'anticorps spécifiques (SAN pour *Specific Antibody Negative*) afin d'éviter la présence d'autres éléments pouvant interférer et empêcher la réplication du virus. Toutes les manipulations ont été faites en laboratoire P3 car la souche utilisée est extrêmement pathogène.

La première chose à faire est de repérer l'embryon à travers la coquille. Pour y parvenir on se place dans l'obscurité et on éclaire l'œuf avec une lampe torche. L'œuf est disposé de telle sorte que la chambre à air soit située vers le haut (zone où l'on fait l'inoculation). On arrive à distinguer à travers la coquille l'ombre de l'embryon. On marque alors un repère avec un crayon à papier sur le côté opposé à celui où se trouve l'embryon (on évite ainsi de blesser l'embryon avec l'aiguille au moment de l'inoculation). On désinfecte la zone choisie avec de l'alcool et de l'éosine afin d'éviter toute contamination. On perce la coquille grâce à une aiguille de calibre 18. On inocule ensuite du virus en utilisant une seringue à tuberculine de calibre 24 dont l'aiguille mesure 1 pouce de long. L'aiguille est insérée de façon verticale aux $\frac{3}{4}$ de sa longueur dans l'œuf (Fig. 10). On injecte 0,2 mL d'inoculum (eau centrifugée ou broyat d'escargot) dans l'allantoïde à travers la chambre à air. On scelle ensuite l'orifice avec de la colle et les œufs sont incubés à 37 °C pendant 3 jours. Toutes les 24 heures (J1 et J2) on examine les œufs pour vérifier que l'embryon est toujours vivant. Pour cela on détecte les mouvements de l'embryon dans l'œuf, ainsi que la présence des vaisseaux sanguins à travers la paroi (Fig. 11). Si l'embryon est mort, l'œuf est retiré de l'incubateur est placé directement à 4 °C pour le test d'hémagglutination. Si l'œuf est vivant, le virus va pouvoir se répliquer dans les cellules et se multiplier. Les nouvelles particules seront libérées dans le liquide allantoïdien. Une fois le processus terminé, on retire les œufs de l'incubateur et on les congèle à 4 °C pendant 12 heures pour tuer les embryons et détruire les vaisseaux sanguins (Potima, 2005). On utilise des ciseaux pour ôter le haut de la coquille, au-dessus de la chambre à air. Pour récupérer le virus, on utilise une pipette plastique et on prélève 1 à 2 mL de fluide allantoïdien que l'on conserve à - 20 °C (Fig. 12). Pour chaque échantillon on a utilisé deux œufs afin d'avoir un duplicat et éviter des pertes d'embryons avant la fin de la période impartie pour l'incubation. Il a été décidé de regrouper les deux échantillons E001 et E002 dans le même œuf car il s'agissait des deux escargots témoins, prélevés avant l'ajout de la solution virale. Lorsque le résultat d'un œuf est négatif, le liquide allantoïque de l'œuf négatif est réinjecté dans un nouvel œuf, suivant le standard défini par l'OIE (Manuel terrestre de l'OIE, 2005). Le résultat d'un prélèvement est considéré comme positif dès que l'hémagglutination est constatée pour au moins l'un des quatre œufs.

Le calendrier d'inoculation du 1^{er} passage sur œufs embryonnés est présenté en Annexe 2. On a effectué deux passages par culture sur œufs embryonnés pour les échantillons résultants négatifs après le test d'hémagglutination du premier passage. On a ré inoculé les liquides allantoïques dans de nouveaux œufs afin de faire une deuxième mise en culture. Au sein du

laboratoire de l'Université, il est préconisé d'effectuer au minimum deux passages sur œufs afin d'optimiser les chances de réplication du virus.

L'étape suivante a consisté à tester la présence de virus H5N1 grâce au test d'hémagglutination.

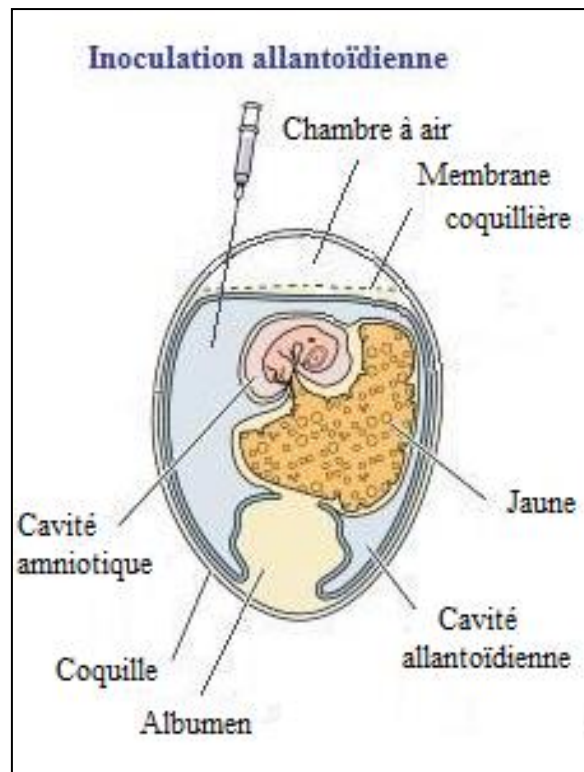


Figure 10 : Schéma d'inoculation allantoïdienne d'un échantillon dans un œuf fécondé de poule ayant 9 à 11 jours (d'après <http://www.virology.ws/2009/12/10/influenza-virus-growth-in-eggs/>).

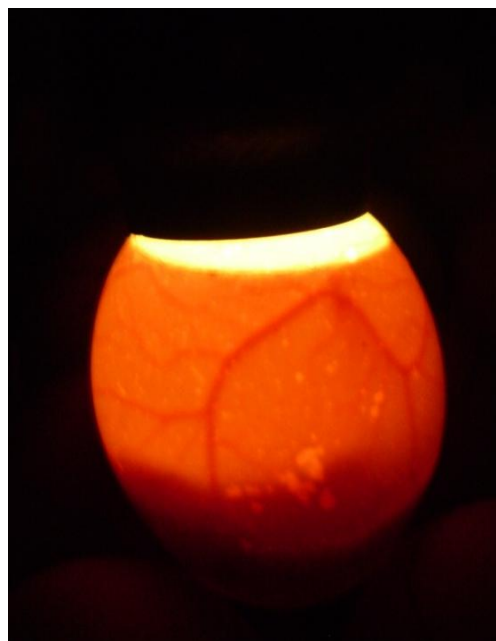


Figure 11: Technique pour voir si l'embryon est vivant ou pas.

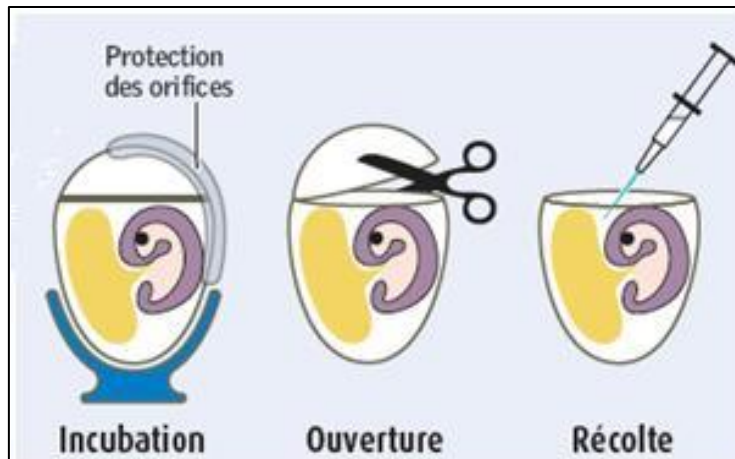


Figure 12: Schémas des différentes étapes de la production de virus H5N1 (d'après <http://static.terrenature.ch/shema%20vaccin.png>).

2. 4. Test de sensibilité

Afin de vérifier la pertinence et la fiabilité de la technique utilisée (production de virus par mise en culture sur œufs embryonnés suivie d'un test d'héماغglutination), on a mis au point un test de sensibilité. Ce test a consisté à infecter plusieurs œufs selon trois concentrations virales différentes (1 $\text{DICT}_{50}/\text{mL}$, 5 $\text{DICT}_{50}/\text{mL}$ et 10 $\text{DICT}_{50}/\text{mL}$). Les différents résultats sont présentés dans les tableaux n°3, 4 et 5. Pour chaque concentration, on a infecté 1 L d'eau avec du virus puis on a inoculé 40 œufs en effectuant deux passages. L'objectif était de voir si grâce à cette technique on pouvait répliquer de faibles concentrations virales contenues dans nos échantillons (eau et escargots) et les détecter grâce à l'héماغglutination.

Tableau 3 : Test de sensibilité à une concentration de 1 DICT₅₀/mL.

1 TCID ₅₀				
Identifiant	Passage 1		Passage 2	
	Résultat test	Durée de l'œuf	Résultat test	Durée de l'œuf
1	-	J3	-	J3
2	+	J3		
3	-	J3	+	J1
4	+	J3		
5	-	J3	+	J2
6	-	J3	+	J3
7	-	J3	+	J1
8	-	J3	-	J3
9	+	J2		
10	-	J3	-	J3
11	-	J3	-	J3
12	-	J3	-	J3
13	+	J3		
14	+	J2		
15	-	J3	+	J2
16	-	J3		J2
17	-	J3	+	J2
18	+	J2		
19	-	J3	-	J3
20	-	J3	-	J3
21	-	J3	-	J1
22	-	J3	-	J3
23	+	J2		
24	-	J3	-	J3
25	-	J3	+	J1
26	-	J3	-	J3
27	-	J3	-	J3
28	-	J3	-	J3
29	-	J3	-	J3
30	-	J3	-	J1
31	-	J2		J3
32	+	J2		
33	-	J3	+	J1
34	+	J3		
35	+	J2		
36	-	J1	+	J1
37	-	J3	-	J3
38	+	J2		
39	-	J3	-	J3
40	-	J3	-	J1

À une concentration de 1 DICT₅₀/mL, on a obtenu 50 % des œufs positifs (20 œufs sur 40). Au premier passage, 11 œufs ont été testés positifs et 9 au second passage. Il faut noter que 2 œufs n'ont pu être testés (œufs n° 16 et 31).

Tableau 4 : Test de sensibilité à une concentration de 5 DICT₅₀/ mL.

5 TCID ₅₀				
Identifiant	Passage 1		Passage 2	
	Résultat test	Durée de l'œuf	Résultat test	Durée de l'œuf
1	-	J3	-	J3
2	+	J2		
3	+	J2		
4	-	J3	-	J1
5	-	J3	+	J1
6	-	J3	-	J1
7	+	J2		
8	-	J2	+	J1
9	-	J3	-	J3
10	-	J3	+	J2
11	-	J1	+	J1
12		J1		
13	-	J3	-	J3
14	+	J2		
15	+	J2		
16	+	J2		
17	+	J2		
18	-	J3	-	J3
19	+	J2		
20	-	J3	-	J3
21	-	J3	-	J1
22	-	J3	-	J3
23	-	J2	+	J1
24	+	J2		
25	+	J2		
26	+	J2		
27	+	J2		
28	-	J3	-	J1
29	-	J3	-	J3
30	-	J3		J3
31	+	J2		
32	-	J3	-	J3
33	+	J2		
34	-	J2	-	J1
35	-	J3		J3
36	-	J3		J3
37	-	J3	-	J3
38	+	J2		
39	+	J2		
40	+	J2		

À une concentration de 5 DICT₅₀/mL, on a obtenu 55 % des œufs positifs (22 œufs sur 40).
 Au premier passage, 17 œufs ont été testés positifs et 5 au second passage. Il faut noter que 3 œufs n'ont pu être testés (œufs n° 30, 35 et 36).

Tableau 5 : Test de sensibilité à une concentration de 10 DICT₅₀ / mL.

10 TCID ₅₀				
Identifiant	Passage 1		Passage 2	
	Résultat test	Durée de l'œuf	Résultat test	Durée de l'œuf
1	-	J3	-	J3
2	-	J3	-	J3
3	+	J2		
4	-	J3	-	J3
5	+	J2		
6	-	J3	+	J1
7	+	J2		
8	-	J3	-	J3
9	+	J2		
10	-	J1	+	J1
11	+	J2		
12	-	J3	-	J1
13	+	J2		
14	+	J2		
15	+	J2		
16	+	J2		
17	+	J2		
18	-	J3	-	J3
19	-	J3	-	J1
20	-	J3	+	J1
21	+	J2		
22	-	J3	+	J1
23	+	J2		
24	-	J3	-	J1
25	+	J2		
26	+	J2		
27	+	J2		
28	-	J3		J3
29	-	J3	-	J3
30	+	J2		
31	-	J3	-	J3
32	-	J3	-	J1
33	-	J3	-	J3
34	+	J2		
35	-	J3	-	J3
36	+	J2		
37	+	J2		
38	+	J3		
39	+	J3		
40	-	J2		

À une concentration de 10 DICT₅₀/mL, on a obtenu 62,5 % des œufs positifs (25 œufs sur 40). Au premier passage, 21 œufs ont été testés positifs et 4 au second passage. Il faut noter que 2 œufs n'ont pu être testés (œufs n° 28 et 40).

Le test de sensibilité donne une fiabilité entre 50 et 65 % ce qui est relativement faible mais qui peut s'expliquer par le fait que les concentrations de départ soient basses (1, 5 et 10 DICT₅₀/mL au lieu de 10² DICT₅₀/mL au cours de l'expérience). Le deuxième passage augmente la sensibilité du test et c'est pour cela qu'il est recommandé d'effectuer plusieurs mises en culture sur œufs. Il faut également tenir compte du nombre d'œufs qui n'ont pu être soumis à un test d'hémagglutination (7 œufs au total) afin de nuancer ces proportions.

2. 5. Tests diagnostics du virus

Pour détecter la présence du virus H5N1 on utilise un test sérologique, le test d'hémagglutination (HA). Ce test, utilisé dans le diagnostic sérologique de routine, est simple à utiliser et a un coût faible. On a également utilisé la technique de RT-PCR quantitative, afin de confirmer le premier diagnostic obtenu par test HA. Les échantillons d'escargots ont été ensuite soumis à une RT-PCR quantitative. Cette technique est nettement plus sensible que le test d'hémagglutination. De plus, on peut calculer la concentration virale de l'échantillon de départ.

2. 5. 1 Test d'hémagglutination (HA)

Le principe du test d'hémagglutination consiste en l'agglomération des hématies autour d'un complexe immun anticorps-antigènes. Dans notre cas, nous n'avons pas recours à des anticorps car les virus influenza ont la faculté de se fixer au niveau des globules rouges grâce à une protéine située en surface, l'hémagglutinine. L'hémagglutinine comme son nom l'indique, crée l'agglutination des globules rouges qui précipitent quand ils sont mis en contact avec le virus. Le virus va se fixer au niveau des acides sialiques situés à la surface des hématies. Le test HA est très utilisé étant donné sa rapidité, sa bonne sensibilité (82 %) et son faible coût (Weinberg *et al.*, 2005).

Avant d'utiliser cette technique, on a défini la sensibilité du test HA pour différentes concentrations données.

Une fois la sensibilité établie, on utilise une microplaque de 96 puits à fond en V. Le protocole utilisé et celui mis en place au sein du laboratoire. Les réactifs utilisés sont les liquides allantoïdiens des échantillons d'eau et d'escargots récupérés dans les œufs embryonnés. On utilise également des globules rouges d'oies (GR) à 0,5 %. On utilise des GR d'oies car c'est l'espèce dont les érythrocytes confèrent le meilleur avantage pour l'hémagglutination (Louisiriratchanakul *et al.*, 2007). On ajoute dans chaque puits 50 µL d'échantillon puis 50 µL de GR. Pour le témoin négatif, on dépose 50 µL de PBS à 1X (tampon isotonique qui sert de diluant) et 50 µL de GR. Pour chaque échantillon, on a utilisé deux puits afin d'avoir un duplicat. On met ensuite à incuber pendant 30 min à 4°C. On vérifie ensuite à l'œil nu s'il y a eu hémagglutination ou pas. Les résultats positifs doivent être soumis au test HI pour valider le diagnostic. Étant donné que l'on a simplement cherché à savoir s'il y avait présence de virus ou pas, on n'a pas effectué de dilutions.

Le test d'hémagglutination est considéré positif dès lors que se forme un « voile » dans le puits, cela signifie qu'il y a eu agglutination entre les hématies et le virus. Il est négatif lorsque les globules rouges tombent au fond du puits sans qu'il y ait agglutination. On distingue alors un point rouge au fond du puits (Potima, 2005). Pour chaque échantillon, on a fait un duplicat. On a estimé qu'un échantillon était considéré positif dès lors qu'il y avait hémagglutination au cours du test HA pour au moins l'un des deux œufs testés. On a également effectué un test témoin c'est-à-dire que l'on a prélevé des escargots et de l'eau de chaque bac avant d'ajouter la solution virale puis on a effectué un test d'hémagglutination pour vérifier les conditions de départ de notre expérience.

2. 5. 2 RT-PCR quantitative

La RT-PCR est une technique de biologie moléculaire. Il s'agit d'une PCR en deux étapes qui permet, à partir de l'ARN d'un antigène, la synthèse et l'amplification du brin d'ADN complémentaire. Tout d'abord il faut extraire l'ARN des échantillons. Pour effectuer l'extraction, on utilisera le protocole établi par le laboratoire de la Faculté Vétérinaire qui apparaît en Annexe 3. Une fois l'extraction effectuée, on peut mettre en route une RT-PCR.

La première étape consiste en une transcription inverse (RT : 'reverse transcriptase'), c'est-à-dire qu'à partir de l'ARN du virus (le virus H5N1 étant un virus à ARN), on va synthétiser le brin d'ADN complémentaire. Dans un deuxième temps, on va amplifier l'ADN de départ par une PCR classique en utilisant des amorces spécifiques du virus H5N1. Les amplicons obtenus seront analysés grâce au programme Rotor-Gene Real-Time Analysis Software 6. 1. Le gène H5 a été le gène cible de notre qRT-PCR

Cette technique, très sensible, a été utilisée afin de vérifier le statut des échantillons des escargots établi par le test HA. Ce type de PCR permet de calculer la concentration initiale de particules virales dans les échantillons d'origine en temps réel grâce à une sonde. Elle a comme inconvénient de ne pas faire la différence entre la détection de virus vivant et de virus inactivé. De plus, le risque de contamination est réel ce qui peut fausser les résultats.

On a utilisé le kit SuperScript. III One-Step RT-PCR System (Invitrogen) pour la RT-PCR. Les différents réactifs utilisés sont présentés dans le tableau n°6.

Tableau 6 : Mix de réaction de la qRT-PCR.

Réactifs	Volume (µL)
2X Reaction Mix (tampon contenant 0.4 mM de chaque dNTP, 3.2 mM MgSO4)	10
Amorce Forward (H5-F) (20µM)	0,4
Amorce Reverse (H5-R) (20 µM)	0,4
Sonde (H5-P) (10 µM)	0,4
SuperScript ^{III} RT / Platinum [®] Taq Mix	0,4
Eau sans RNase	3,4
ARN extrait	5
TOTAL	20

Pour le témoin positif on a sélectionné un plasmide contenant le gène H5. On a effectué une série de dilutions au 10^e afin d'avoir plusieurs standards. Comme témoin négatif, on a utilisé de l'eau libre d'ARN. Le programme de la RT-PCR est détaillé dans le tableau n°7.

Tableau 7 : Programme du thermocycleur pour la qRT-PCR.

Cycle PCR	Température (°C)	Durée	Nombre de cycles
Transcriptase Inverse	50	15 min	1
Dénaturation initiale	95	2 min	1
Dénaturation	95	15 s	40
Élongation	60	60 s	
Hold	40	2 min	

Une fois, la PCR effectuée, les échantillons ont été analysés grâce au logiciel Rotor-Gene Real-Time Analysis Software 6. 1.

III. Résultats

1. Test d'hémmagglutination

Les premières analyses ont été faites par le test d'hémmagglutination. Sur la figure ci-dessous (Fig. 13) on s'aperçoit que l'échantillon n°1 présente un « voile » qui signifie qu'il y a eu hémmagglutination entre l'antigène et les hématies d'oie. Le puits de l'échantillon n°2 montre un point rouge qui signifie que les érythrocytes n'ont pas rencontré de virus et qu'ils sont tombés au fond du puits.

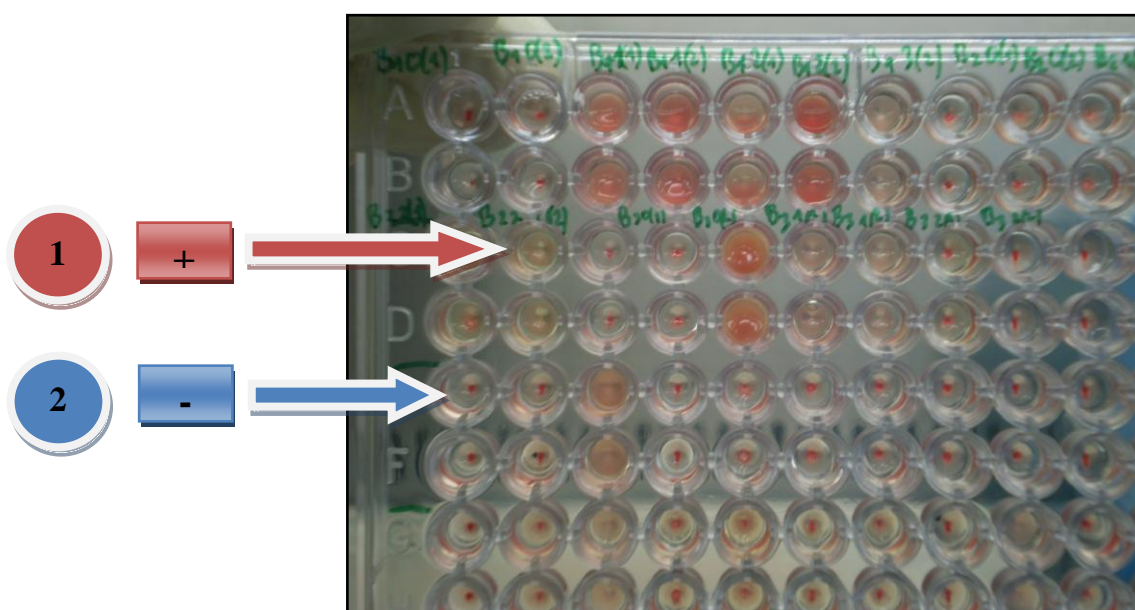


Figure 13 : Résultats d'un test d'hémmagglutination.

L'analyse diagnostique a été effectuée sur 14 jours (03/09/10 au 16/09/10). 14 sessions de prélèvements d'eau et 35 escargots ont été testés. Une grande quantité d'œufs n'a pas incubé pendant 72 h car les embryons sont morts avant (soit au bout de un jour ou soit au bout de deux jours). On a quand même pu faire un test HA et les résultats ont été pris en compte. Ces résultats, selon les trois modalités (eau sans escargot, eau avec escargots et escargots), ont été regroupés et présentés dans les Tableaux 8 à 11. Pour chaque échantillon, on a indiqué les résultats des deux passages sur œufs. On a également précisé à chaque fois, l'identifiant, le nombre de jours du prélèvement après ajout de la solution virale, le résultat du test et le nombre de jours de vie de l'œuf embryonné après inoculation.

À la fin de l'expérience on a retrouvé 40 escargots dans le récipient n°2 et 28 dans le récipient n°3. Sachant qu'on a prélevé 17 escargots dans le récipient n°2 et 18 dans le récipient n°3, la mortalité a été de 5 % et 23 % respectivement.

1. 1. Persistance du virus dans l'eau sans escargots (bacs B1 et B4)

Tableaux 8 et 9 : Test HA sur l'eau des récipient B1 et B4. + : échantillon positif ; - : échantillon négatif.

Bac 1 (eau sans escargots)										
Identifiant	Œuf n°1					Œuf n°2				
	Passage 1			Passage 2		Passage 1			Passage 2	
	Inoculation	Résultat	Survie de l'œuf	Résultat	Survie de l'œuf	Inoculation	Résultat	Survie de l'œuf	Résultat	Survie de l'œuf
B1 0	J0	-	J3	-	J3	J1	-	J3	-	J3
B1 1	J1	+	J2			J1	+	J2		
B1 2	J3	+	J2			J3	-	J1	-	J1
B1 3	J3	-	J1	-	J3	J3	-	J2	-	J3
B1 4	J4	-	J3	+	J2	J4	-	J3	-	J3
B1 5	J5	+	J2			J5	-	J3	-	J3
B1 6	J6	-	J3	-	J3	J6	-	J3	-	J3
B1 7	J7	-	J3	-	J3	J7	-	J3	-	J3
B1 8	J8	-	J3	+	J1	J8	-	J3	-	J3
B1 9	J9	-	J3	-	J3	J9	-	J3	-	J3
B1 10	J10	-	J3	-	J3	J10	-	J3	-	J3
B1 11	J11	+	J3	-	J3	J11	-	J3	-	J3
B1 12	J12	-	J3	+	J2	J12	-	J3	-	J3
B1 13	J13	-	J3	-	J3	J13	-	J3	-	J3
B1 14	J14	-	J3	-	J3	J14	-	J3	-	J3

Le témoin B1 0 est négatif comme attendu. Les prélèvements B1 1 (les deux œufs), B1 2 (un seul œuf), B1 4 (un seul œuf), B1 5 (un seul œuf), B1 8 (un seul œuf), B1 11 (un seul œuf) et B1 12 (un seul œuf) donnent des résultats positifs. On a donc mis en évidence la présence du virus vivant dans l'eau au-delà d'une dizaine de jours suivant l'infection. Il est également intéressant de noter qu'aucun des œufs testés positifs n'a survécu plus de 48 h (sauf B1 11 (1)) alors que tous les œufs testés négatifs (hormis B1 3 (1)) ont survécu jusqu'à la fin de la période d'incubation de 3 jours.

Bac 4 (eau sans escargot)										
Identifiant	Œuf n°1					Œuf n°2				
	Passage 1			Passage 2		Passage 1			Passage 2	
	Inoculation	Résultat	Survie de l'œuf	Résultat	Survie de l'œuf	Inoculation	Résultat	Survie de l'œuf	Résultat	Survie de l'œuf
B4 0	J0	-	J3	-	J3	J0	-	J3	-	J3
B4 1	J1		J2			J1	+	J2		
B4 2	J3	-	J3	-	J3	J3	-	J3	-	J3
B4 3	J3	-	J3	+	J3	J3	-	J1	-	J3
B4 4	J4	-	J3	-	J1	J4	-	J3	-	J3
B4 5	J5	-	J3	-	J3	J5	-	J3	+	J1
B4 6	J6	-	J3	-	J3	J6	-	J1	+	J1
B4 7	J7	-	J1	-	J3	J7	-	J3	-	J3
B4 8	J8	-	J3	-	J2	J8	-	J3	-	J2
B4 9	J9	-	J3	-	J3	J9	-	J3	-	J3
B4 10	J10	-	J3	-	J3	J10	-	J3	-	J3
B4 11	J11	-	J3	-	J3	J11	-	J3	-	J3
B4 12	J12	-	J3	-	J3	J12	-	J3	-	J3
B4 13	J13	-	J3	-	J3	J13	-	J3	-	J3
B4 14	J14	-	J3	-	J3	J14	-	J3	-	J3

Les 2 témoins sont négatifs. 4 échantillons sont positifs (B4 1, B4 3, B4 5 et B4, 6). On a retrouvé du virus jusqu'à moins d'une semaine dans l'eau. Les œufs ayant donné des résultats positifs ont survécu moins de 3 jours. L'œuf B4 1 (1) n'a pu être analysé.

1. 2. Persistance du virus dans l'eau avec escargots (bacs B2 et B3)

Tableaux 10 et 11 : Test HA sur l'eau des récipients B2 et B3. + : échantillon positif ; - : échantillon négatif.

Bac 2 (eau avec escargots)										
	Œuf n°1					Œuf n°2				
	Passage 1			Passage 2		Passage 1			Passage 2	
Identifiant	Inoculation	Résultat	Survie de l'œuf	Résultat	Survie de l'œuf	Inoculation	Résultat	Survie de l'œuf	Résultat	Survie de l'œuf
B2 0	J0	-	J3	-	J3	J0	-	J3	-	J3
B2 1	J1	+	J2			J1	+	J2		
B2 2	J3	-	J1	-	J1	J3	-	J3	+	J1
B2 3	J3	-	J3	-	J3	J3	-	J3	-	J3
B2 4	J4	-	J3	-	J3	J4	-	J2	+	J2
B2 5	J5	+	J2			J5	-	J3	-	J3
B2 6	J6	+	J2			J6	-	J3	-	J3
B2 7	J7	-	J3	-	J3	J7	-	J3	-	J3
B2 8	J8	-	J3	-	J3	J8	-	J3	-	J3
B2 9	J9	-	J3	-	J3	J9	-	J3	-	J3
B2 10	J10	-	J3	-	J3	J10	-	J3	-	J3
B2 11	J11	-	J3	-	J3	J11	-	J1	-	J3
B2 12	J12	-	J3	-	J3	J12	-	J3	-	J3
B2 13	J13	-	J3	-	J3	J13	-	J3	-	J3
B2 14	J14	-	J1	-	J3	J14	-	J3	-	J3

Dans ce bac, les témoins négatifs sont bien négatifs. Les échantillons B2 1 (2 œufs), B2 2, B2 4, B2 5 et B2 6 (1 seul œuf à chaque fois) sont positifs. On ne retrouve plus de virus après une semaine d'infection. Les embryons des 6 œufs positifs sont morts au bout d'un jour (B2 2 (2)) et deux jours (B2 1 (1), B2 1 (2), B2 4 (2), B2 5 (1) et B2 6 (1)).

Bac 3 (eau avec escargots)										
	Œuf n°1					Œuf n°2				
	Passage 1			Passage 2		Passage 1			Passage 2	
Identifiant	Inoculation	Résultat	Survie de l'œuf	Résultat	Survie de l'œuf	Inoculation	Résultat	Survie de l'œuf	Résultat	Survie de l'œuf
B3 0	J0	-	J3	-	J3	J0	-	J3	-	J3
B3 1	J1	+	J2			J1	+	J2		
B3 2	J3	-	J3	+	J1	J3	-	J1	-	J3
B3 3	J3	-	J3	+	J2	J3	-	J1	+	J1
B3 4	J4	-	J2	+	J1	J4	-	J2	+	J1
B3 5	J5	-	J3	-	J3	J5	-	J3	-	J3
B3 6	J6	-	J3	-	J3	J6	-	J3	+	J3
B3 7	J7	-	J3	-	J1	J7	-	J3	-	J1
B3 8	J8	-	J3	+	J3	J8	-	J3	-	J1
B3 9	J9	-	J3	-	J3	J9	-	J3	-	J2
B3 10	J10	-	J3	-	J3	J10	-	J1	-	J3
B3 11	J11	-	J3	-	J3	J11		J2		J3
B3 12	J12	-	J3	-	J3	J12	-	J3	-	J3
B3 13	J13	-	J3	-	J3	J13	-	J2	-	J3
B3 14	J14	-	J3	-	J3	J14	+	J3	-	J3

Les témoins sont là encore négatifs. On retrouve du virus entre le 1^{er} et le 4^e jour (les échantillons B3 1, B3 2, B3 3 et B3 4 sont positifs). On retrouve également du virus à J6, J8 et J14. Dans ce bac, on retrouve du virus jusqu'à 2 semaines après infection dans l'eau contenant des escargots. Les embryons des œufs B3 1 (1) et (2), B3 2 (1), B3 3 (1) et (2), B3 4 (1) et (2) sont morts avant 72h d'incubation. Seuls les embryons B3 6 (2), B3 8 (1) et B3 14 (2) sont allés au bout de la période d'incubation de 3 jours. L'œuf B3 11 (2) n'a pu être testé.

Au sein des deux bacs on a retrouvé du virus aux alentours d'une semaine après infection (J6 pour le bac 2 et J8 pour le bac 3), même si dans le bac 3 à J14 on retrouve un escargot infecté.

1. 3. Persistance du virus chez les escargots (bacs B2 et B3)

Tableaux 12 et 13 : Test HA sur les escargots. + : échantillon positif ; - : échantillon négatif.

Bac 2 (escargots)										
Identifiant	Œuf n°1					Œuf n°2				
	Passage 1			Passage 2		Passage 1			Passage 2	
	Inoculation	Résultat	Survie de l'œuf	Résultat	Survie de l'œuf	Inoculation	Résultat	Survie de l'œuf	Résultat	Survie de l'œuf
E001	J1	+	J3			J1	+	J3		
E002	J1	-	J3	+	J1	J1	-	J3	+	J2
E003	J1	+	J2			J1	+	J2		
E006	J3	-	J3	+	J1	J3	-	J3	-	J3
E007	J3	-	J3	+	J2	J3	-	J3	-	J3
E011	J5	-	J3	-	J3	J5	-	J3	-	J3
E012	J5	+	J3			J5	-	J3	+	J1
E013	J5	+	J2			J5	+	J2		
E016	J7	-	J3	-	J3	J7	-	J1	+	J2
E017	J7	-	J3	+	J3	J7	-	J1	-	J2
E021	J9	-	J3	-	J3	J9	-	J3	-	J2
E022	J9	-	J3	-	J3	J9	-	J3	-	J3
E023	J9	-	J3	-	J3	J9	-	J1	-	J3
E026	J11	-	J3	-	J1	J11	+	J3		
E027	J11	-	J3	-	J3	J11	-	J3	-	J3
E031	J13	-	J3	-	J3	J13	-	J3	-	J3
E032	J13	-	J3	-	J3	J13	-	J3	-	J3
E033	J13		J2			J13	-	J3	-	J3

Dans le Bac n°2 on a trouvé 50 % d'escargots infectés (9 escargots sur 18). Les 3 escargots à J1 ont été testés positifs (les 2 œufs sont positifs pour E001, E002 et E003). Pour J3, les 2 escargots sont également positifs (un seul œuf testé positif pour E006 et E007). À J5, deux escargots sur trois (E012 et E013) ont été considérés infectés. À J7 on a également 100 % d'escargots infectés (E016 et E017). On retrouve enfin, un escargot infecté à J11 (E026).

Au cours des 7 premiers jours d'infection on a donc 90 % d'escargots infectés (9 escargots sur 10). Après une semaine, un seul escargot (E026) sur 8 a été déclaré positif. Au-delà de 11 jours on ne retrouve plus de virus au sein des escargots. Sur les 15 œufs testés positifs, 10 d'entre eux, ont incubés moins de 3 jours.

Bac 3 (escargots)										
	Œuf n°1					Œuf n°2				
	Passage 1			Passage 2		Passage 1			Passage 2	
Identifiant	Inoculation	Résultat	Survie de l'œuf	Résultat	Survie de l'œuf	Inoculation	Résultat	Survie de l'œuf	Résultat	Survie de l'œuf
E004	J1	+	J2			J1	-	J3	-	J3
E005	J1	+	J2			J1	+	J2		
E008	J3	-	J2	-	J3	J3	-	J3	+	J3
E009	J3	-	J3	-	J3	J3	-	J3	+	J3
E010	J3	-	J3	+	J1	J3	-	J3	-	J3
E014	J5	-	J3	-	J3	J5	-	J3	-	J3
E015	J5	+	J1			J5	+	J2		
E018	J7	-	J3	-	J3	J7	-	J3	-	J2
E019	J7	-	J3	-	J3	J7	-	J3	-	J3
E020	J7	-	J3	+	J1	J7	-	J3	-	J3
E024	J9	-	J3	-	J3	J9	-	J3	-	J3
E025	J9	-	J3	-	J3	J9	-	J3	-	J3
E028	J11	-	J3	-	J3	J11	-	J3	-	J3
E029	J11	-	J3	-	J3	J11	-	J3	-	J3
E030	J11	-	J3	-	J3	J11	-	J3	-	J3
E034	J13	-	J3	-	J3	J13	-	J3	-	J3
E035	J13	-	J3	-	J3	J13	-	J3	-	J3

Dans ce bac, on a retrouvé 41 % d'escargots infectés (7 escargots sur 17). 100 % des escargots sont positifs jusqu'à 3 jours après infection (E004, E005, E008, E009 et E010). À J5, un seul escargot est positif (E015). Enfin à J7 un seul escargot sur trois est testé positif (E020). On ne retrouve plus de virus après une semaine au sein des escargots. Sur les 9 œufs testés positifs, 7 d'entre eux ont incubé moins de 3 jours.

Au total, on a trouvé 46 % d'escargots positifs (16 escargots sur 35). Les résultats entre les deux bacs sont sensiblement similaires, à savoir qu'on retrouve presque 100 % d'escargots infectés la première semaine (90 % pour le bac 2 et 100 % pour le bac 3). Au-delà d'une semaine on ne retrouve presque plus d'escargots infectés (1 seul pour le bac 2 et aucun pour le bac 3).

2. RT-PCR quantitative

Les résultats de la RT-PCR quantitative sont présentés dans le tableau n°13.

Tableau 13 : Concentration virale des échantillons d'escargots.

Concentration des échantillons originaux		
	concentration dans 5 µL	concentration par mL
E001	/	/
E002	281,623	281623
E003	36,561	36561
E004	206,413	206413
E005	202,521	202521
E006	58,505	58505
E007	/	/
E008	/	/
E009	/	/
E010	211,51	211510
E011	261,946	261946
E012	901,819	901819
E013	/	/
E014	/	/
E015	768,519	768519
E016	/	/
E017	4764,843	4764843
E018	/	/
E019	/	/
E020	3154,517	3154517
E025	179,074	179074
E026	/	/
E027	829,3	829300
E029	1686,624	1686624
E030	/	/

échantillon testé négatif par le test HA
 échantillon testé positif par le test HA

Sur les 35 escargots prélevés, seuls 25 échantillons ont pu être soumis à la technique de PCR quantitative. Parmi ces 25 échantillons, on n'a pu déterminer la concentration virale de 14 escargots seulement (56 % des escargots). Les résultats sont assez disparates et ne tiennent pas forcément compte des résultats obtenus par le test HA. On remarque que certains échantillons testés négatifs par le test HA, ont une concentration virale importante comme les échantillons E011, E025, E027 et E029. Néanmoins, on constate que les échantillons ayant les concentrations les plus élevées, sont ceux qui ont été prélevés après 5 jours d'infection (E012, E015, E017, E020, E027 et E029). Les échantillons E002, E003, E004, E005 et E006 ont les concentrations les plus basses.

IV. Discussion

L'objectif de ce projet était d'étudier et de comparer la persistance du virus H5N1 dans plusieurs compartiments et notamment chez des escargots d'eau douce de type ampullaire (espèce largement présente en Thaïlande). En effet, suite aux nombreuses émergences et réémergences du virus H5N1, il est envisageable de supposer que le virus dispose de réservoirs naturels autres que les oiseaux sauvages. La persistance peut être influencée par l'eau ou des animaux aquatiques, même si elle est encore mal connue dans l'environnement et notamment en Thaïlande.

Ce travail s'est effectué en parallèle à celui effectué en France (Université Lyon I) sur des ampullaires des Dombes, même si les techniques et les protocoles utilisés ont été différents.

Il y a eu au total 39 échantillons (eau et escargots) testés positifs à partir de 52 œufs embryonnés. Sur ces échantillons, 75 % d'entre eux (39/52) ont été obtenus par mise en culture sur des œufs qui n'ont pu incuber pendant 72 h. Le virus H5N1 semble avoir un effet létal sur l'embryon. En effet, si l'on compare avec les échantillons négatifs (298 œufs testés négatifs), on n'a obtenu que 10 % d'embryons (31/298) morts avant les 72 h. Cependant, même si le virus peut provoquer la mort de l'embryon du fait de sa multiplication, les tests ont pu être effectués et les résultats pris en compte. D'autres éléments peuvent expliquer le fait qu'un embryon meurt avant la période de 3 jours d'incubation. Une mauvaise insertion de l'aiguille peut blesser ou tuer l'embryon, des bactéries ou d'autres pathogènes sont susceptibles de se multiplier dans l'œuf et tuer l'animal.

Sur les 39 échantillons testés positifs, 59 % c'est-à-dire 23 échantillons l'ont été grâce au 2nd passage en culture sur œufs embryonnés. Cet élément montre que la sensibilité du test augmente considérablement lorsqu'on multiplie le nombre de passages en culture sur les œufs embryonnés.

Ce travail était innovant car l'animal étudié pour le virus H5N1 était un mollusque et non un mammifère (réservoir naturel de ce virus). En effet, hormis l'équipe de Lyon I, aucun travail n'avait été effectué à ce jour, sur les aspects de persistance d'un virus Influenza aviaire au sein de mollusques gastéropodes d'autant plus que ceux-ci possèdent les acides sialiques permettant la fixation du virus aux cellules. On a testé directement la présence du virus à partir d'un broyage de plusieurs organes en passant par le stade de culture sur œufs embryonnés et en utilisant le test d'hémagglutination comme moyen de diagnostic. Afin d'optimiser la sensibilité du test, un second passage sur œufs embryonnés a été effectué en suivant les recommandations de l'OIE. Pour les échantillons d'escargots, on a également effectué une RT-PCR quantitative afin d'estimer la concentration virale dans les échantillons d'origine. Cette technique de biologie moléculaire est très sensible car nécessite moins de trois copies d'ARN du gène cible du virus pour donner un résultat positif (Chen *et al.*, 2007). Néanmoins, du fait de sa grande sensibilité, la spécificité n'est pas de 100 % ce qui peut entraîner de faux positifs par contamination extérieure (Bagory, 2006).

Concernant la validité des deux techniques, le test d'hémagglutination est la technique qui donne la meilleure spécificité car on obtient le plus grand nombre de vrais négatifs. En effet, la qRT-PCR est sujette à plus de contaminations et biais. À l'inverse cette dernière donne une meilleure sensibilité car la quantité minimale d'ARN pour la détection est inférieure à celle pour le test HA.

1. Persistance du virus dans l'eau

Le premier compartiment étudié était l'eau. Deux modalités différentes ont été étudiées. Dans les bacs 1 et 4, on avait de l'eau seule et dans les deux autres bacs, de l'eau contenant les ampullaires. Les différentes expériences ont permis de montrer que le virus H5N1 était capable de survivre et persister dans l'eau quelques jours, à une température proche de 30 °C. À cette température là, le virus a survécu entre 6 (échantillons des récipients n°2 et 4) et 14 jours (prélèvements dans le récipient n°3). On ne peut affirmer que la présence des escargots dans l'eau ait une importance sur la durée de persistance du virus. En effet, la durée de persistance du virus est la même entre le bac n°2 (bac avec escargots) et le bac n°4 (bac sans escargots). On sait que le temps de survie des virus Influenza dans l'eau est inversement proportionnel à la température (Brown *et al.*, 2006 ; Akbar *et al.*, 2009). À 4 °C le virus peut survivre 100 jours (Akbar *et al.*, 2009). À une température proche des conditions naturelles en Thaïlande (en moyenne 30 °C), le virus n'est censé être infectieux que quelques jours (Stallknecht et Brown, 2009). À 28 °C, le virus est inactivé au bout de 24 h (Akbar *et al.*, 2009). Néanmoins, il y a un manque d'informations concernant la survie et la virulence du virus H5N1 dans l'eau. On dispose de peu de données fiables à propos du sous-type H5N1 et le rôle des conditions environnementales dans la propagation du virus est encore mal connu. L'équipe de la Faculté Vétérinaire a mené de nombreuses missions sur le terrain dans le but de trouver dans l'eau, du virus H5N1 vivant. Néanmoins, aucune particule n'a été trouvée et la mise en évidence de virus dans l'eau n'a pu être démontrée. D'autres paramètres ont également été étudiés. Des expériences ont été réalisées avec des rayons UV et il n'a pas été démontré qu'ils puissent détruire le virus dans des matières fécales (Chumpolbanchorn *et al.*, 2006). Néanmoins des expériences complémentaires devraient être effectuées pour savoir si les UV sont capables de détruire le virus présent dans l'eau. C'est l'hypothèse que soutient l'équipe du laboratoire de la Faculté Vétérinaire. Les chercheurs estiment que les UV provenant des rayons du soleil, sont responsables de la destruction du virus H5N1 dans l'eau et que cet élément pourrait être un facteur expliquant pourquoi on n'a pas trouvé de virus H5N1 vivant dans l'eau en Thaïlande. Des travaux menés sur une souche de H5N1 hautement pathogène en Thaïlande ont conclu que le virus exposé à la lumière du soleil et à une température comprise entre 32 et 35°C était inactivé au bout de 30 min (Akbar *et al.*, 2009). D'autres hypothèses peuvent être envisagées, à savoir que dans l'eau, le virus est trop dilué ou alors qu'il est détruit par d'autres facteurs.

Le pH est également un facteur qui a fait l'objet de plusieurs études. Des pH extrêmes (acides, 1 et 3 et basiques, 11 et 13) inactivent le virus au bout de 6 h (Akbar *et al.*, 2009). Un pH neutre n'a pas d'effet sur la persistance du virus. On peut légitimement supposer que l'eau n'est donc pas un réservoir viable pour le virus H5N1 et qu'il ne joue pas un rôle de diffusion majeur du virus au cours des différentes épidémies. Un autre élément à prendre en compte dans nos résultats est le fait que la persistance du virus dépend de la concentration initiale en particules virales ajoutées au début de l'infection. En effet, au cours de la 1^{ère} expérience le virus n'avait survécu que 4 jours. Pour cette expérience, du virus a été détecté 14 jours après infection de l'eau. Ces résultats tendent à montrer que la concentration initiale en virus conditionne la durée de persistance dans l'eau. Ainsi, plus la concentration de départ est importante et plus longtemps il y a du virus dans l'eau. Il faut cependant préciser qu'un seul passage sur œuf embryonné a été effectué pour la 1^{ère} expérience, contrairement à deux passages pour la 2^{ème}. La sensibilité est donc plus importante pour la 2^{ème} expérience ce qui influe sur les résultats.

Au cours de cette étude, on ne s'est pas focalisé essentiellement sur la persistance du virus H5N1 dans l'eau. En effet, si tel avait été le cas, il aurait fallu infecter les bacs avec une

concentration virale plus importante et faire des prélèvements plus souvent. En effet, avec une température de l'eau aussi élevée, la durée de persistance attendue est de l'ordre de quelques jours seulement. Pour optimiser l'expérience, plus de prélèvements devraient être effectués dans le but de repérer le moment au cours duquel le virus n'est plus détectable par le test d'hémagglutination. On pourrait ainsi suivre de façon plus précise l'évolution de la persistance du virus H5N1 en effectuant des prélèvements plus rapprochés dans le temps. Une autre hypothèse envisageable serait de tester l'eau directement sans passer par le stade de production de virus dans des œufs embryonnés. Néanmoins, il est peu probable que l'on détecte du virus de cette façon là car la concentration virale serait trop basse. Pour finir, on peut remettre en cause la sensibilité qui pourrait entraîner un biais dans l'interprétation de certains résultats.

2. Persistance du virus dans les escargots

Le comptage des escargots en fin d'expérience a donné 40 individus dans le récipient n°2 et 28 dans le récipient n°3. On a prélevé 18 ampullaires dans le bac 2 et 17 dans le bac 3. La mortalité en 15 jours, a donc été de 2 et 15 escargots dans les bacs 2 et 3 (5 % et 37,5 % respectivement). Celle-ci n'est pas excessive et semble correspondre à ce que l'on observe dans les aquariums de l'élevage. Dans l'aquarium n°2 on a compté 93 escargots le 21/06 et 11 jours plus tard, on n'en a compté plus que 73. La mortalité sur cette période de temps a été de 21 %. Ces résultats semblent indiquer que le virus n'a pas d'effet létal sur les escargots.

Pour les échantillons testés positifs par le test HA on n'a pas pu dans chaque cas déterminer une concentration virale. Concernant les échantillons négatifs par test HA et soumis à une PCR, on a déterminé la concentration virale pour 3 échantillons sur 9 (E016, E027 et E029). On peut estimer que les deux techniques donnent un diagnostic similaire l'une de l'autre même s'il aurait fallu utiliser les deux techniques sur un plus grand nombre d'échantillons pour pouvoir l'affirmer.

À partir des résultats obtenus sur la persistance du virus chez les escargots, on a constaté que celui-ci était présent jusqu'à 11 jours après le début de l'infection. Les résultats tendent à démontrer que les escargots ont la capacité de capter le virus présent au départ dans l'eau. Ceci semble être confirmé par les résultats de la RT-PCR quantitative. En effet, on a pu déterminer une concentration virale chez 14 escargots. Il semblerait donc que l'on retrouve du virus H5N1 au sein de l'escargot. La concentration en virus est plus importante chez les escargots infectés après 5 jours. On peut supposer que l'escargot a besoin d'un laps de temps pour capter et concentrer le virus dans son organisme et que c'est pour cette raison que les escargots E012, E015, E017, E020, E027 et E029 possèdent les concentrations les plus élevées. Néanmoins les résultats de la RT-PCR sont à nuancer. L'absence de concentration pour certains échantillons peut s'expliquer par le fait que pour l'extraction d'ARN on a dilué les échantillons avec du PBS. Dans certains cas il a fallu diluer en plus grande quantité afin d'avoir assez d'échantillon pour pouvoir réaliser la PCR. Cette dilution excessive peut être responsable de la non-détection du virus par la PCR. À l'inverse dans d'autres cas, concernant les 3 échantillons négatifs au test HA mais dont on a estimé la concentration virale par PCR par exemple, cela peut s'expliquer par le fait que la PCR détecte l'ARN du virus qu'il soit vivant ou mort. De plus, ces ARN sont très volatiles et peuvent donc provenir de l'eau qui est en contact avec les escargots. On peut également supposer que certains ARN ne proviennent pas directement de l'intérieur de l'escargot mais plutôt de la coquille ou du tégument du mollusque sans nécessairement être assimilé par l'animal. Le processus de fixation (si fixation il y a) du virus n'est pas encore connu chez les mollusques mais on peut supposer qu'elle est

due à la présence des acides sialiques contenus dans le mucus. Une analyse des échantillons d'organes conservés à – 80 °C est nécessaire afin de comprendre dans quel organe le virus est susceptible de se fixer parmi le poumon, la branchie, le pied ou l'intestin. Chaque organe des individus testés positifs devra être analysé séparément pour voir si l'on détecte du virus vivant grâce à la technique d'immunofluorescence par exemple.

D'après des travaux récents, les ampullaires de Thaïlande sont connus pour être porteurs de différents parasites tels que les nématodes *Gnathostoma spinigerum* (Komalamisra *et al.*, 2009) et *Angiostrongylus cantonensis* et le cestode *Echinostoma ilocanum* (Chobchuenchom et Bhumiratana, 2003 ; Sri-aroon *et al.*, 2005). Il est donc envisageable que ces mollusques soient porteurs d'autres pathogènes également tels que des virus et notamment des virus Influenza aviaires. La présence des acides sialiques, notamment au niveau du mucus est un aspect à prendre en compte car il s'agit du point de fixation des virus sur les cellules réceptrices chez les mammifères.

Les escargots semblent donc capter le virus H5N1 mais on ne peut pas conclure quant à la capacité des ampullaires à multiplier le virus, le disséminer dans l'eau et se comporter comme un réservoir potentiel. D'autres expériences devront être effectuées afin de montrer la capacité de ces mollusques à se comporter comme des vecteurs mécaniques ou des réservoirs potentiels du virus H5N1.

Au cours de cette expérience, la concentration virale de départ a été multipliée par cinq par rapport à la première expérience effectuée. On voit que la persistance chez l'escargot est passée de 4 à 11 jours entre les deux expériences. Ainsi, plus la concentration en virus est élevée au départ et plus longtemps on retrouvera du virus présent au sein des mollusques. Ces derniers pourront capter le virus plus longtemps. Il faut préciser cependant, que lors de la 1^{ère} expérience on n'a effectué qu'un seul passage sur œufs embryonnés (pour la 2^{ème} expérience, deux passages ont été effectués).

Les résultats actuels semblent démontrer que la présence des ampullaires n'influe pas sur la persistance du virus. En effet, on trouve du virus dans les escargots jusqu'à 11 jours, tandis que dans l'eau, le virus est présent pendant 2 semaines (bac 3). Cette persistance est sensiblement la même entre l'eau sans escargot (12 jours pour le bac 1) et celle avec escargots (14 jours pour le bac 3).

À titre d'exemple, les expériences réalisées à Lyon, où l'équipe de chercheurs a pu mettre en évidence la présence d'ARN de virus H5N2 jusqu'à 37 jours dans *Physa fontinalis* et 52 jours dans *Pomacea canaliculata* semblent abonder dans le même sens (même s'il s'agit d'un virus Influenza aviaire différent). Néanmoins, des études supplémentaires sont nécessaires pour déterminer si ces ARN détectés proviennent des particules virales infectieuses présentes dans les mollusques mais aussi pour comprendre le mode de persistance de ces éventuels virus.

V. Conclusion et perspectives

Cette étude est originale car aucune autre étude n'avait été faite sur la persistance éventuelle du virus H5N1 chez les escargots d'eau douce (exceptée l'étude de l'Université Lyon I sur les ampullaires des Dombes). On a voulu, à partir des organes, tester directement la présence du virus en utilisant le test d'hémagglutination à partir de la culture sur œufs embryonnés de poules tout en complétant notre analyse grâce à une technique moléculaire fiable et sensible, la RT-PCR quantitative.

Les résultats obtenus montrent que le virus H5N1 survit aux alentours de 2 semaines dans l'eau à une température proche de 30 °C. Cette durée de temps est inférieure à celle que l'on retrouve pour une température de l'eau plus basse (100 jours pour une eau à 4 °C). Contrairement à l'étude préliminaire menée antérieurement, au cours de cette expérience on a effectué deux passages en culture sur œufs embryonnés (au lieu d'un seul passage) et la concentration virale de départ était 5 fois plus grande. Cela explique le fait que l'on retrouve du virus dans l'eau jusqu'à 2 semaines au lieu de 4 jours pour la 1^{ère} expérience. Plus la concentration au début est importante et plus longtemps on retrouvera du virus dans l'eau. De plus, un 2^e passage sur œufs embryonnés augmente considérablement la sensibilité.

Pour ce qui est de la persistance du virus H5N1 au sein des ampullaires, celle-ci est passée de 4 à 11 jours entre les deux expériences. On peut supposer que cela est dû à la concentration virale plus élevée au cours de la 2^e expérience. Cela permet à l'escargot de capter du virus plus longtemps. On remarque également qu'au cours du temps la concentration virale de l'escargot tend à augmenter ce qui supposerait que l'ampullaire a besoin d'un certain temps avant de pouvoir capter du virus en grande quantité.

On ne peut pas conclure de façon précise quant au rôle joué par les ampullaires dans la persistance du virus H5N1. Ils semblent avoir la capacité d'héberger ce virus pendant plusieurs jours, à une température proche des conditions naturelles rencontrées en Thaïlande. On ne peut cependant pas affirmer si les escargots jouent le rôle de vecteur mécanique ou de réservoir potentiel dans le cycle de circulation du virus. Étant donnée l'importance de la prise en compte de ces mollusques (espèce importante car très répandue en Thaïlande au point de devenir invasive) dans la chaîne de persistance du virus et de la poursuite de l'analyse de la capacité d'hébergement du virus par ces invertébrés aquatiques, d'autres études devront être menées afin de répondre à ces différentes questions. Si ce réservoir secondaire biotique est confirmé, cela permettrait de mieux appréhender les conditions de persistance du virus H5N1 dans l'environnement et ainsi de mieux identifier les zones d'émergences ainsi que les mécanismes de dissémination de ces virus.

En conclusion cette étude a permis de mettre en évidence la présence de virus H5N1 chez les ampullaires (espèce qui n'est pas un hôte naturel des virus influenza aviaire) même si on ne connaît pas encore les modalités de cette présence chez ce mollusque. Une analyse plus poussée sur les différents organes de l'ampullaire serait une démarche intéressante à mener.

Bibliographie

AKBAR SHAHID M., ABUBAKAR M., HAMEED S., HASSAN S., 2009. Avian influenza virus (H₅N₁); effects of physico-chemical factors on its survival. *Virol. J.*; **6** : 38

AUEWARAKUL P., 2008. The Past and Present Threat of Avian Influenza in Thailand. *In* : Emerging Infections in Asia, ed. Y. Lu, et al., London: Springer. p. 31- 44.

BAGORY M., 2006. La PCR et RT-PCR quantitative temps-réel.
<http://www.creatis.insa-lyon.fr/~bagory/documents/La%20PCR%20et%20RT-PCR%20quantitative%20temps-reel.pdf>

BOLOH Y., 2008. L'aviculture en Thaïlande : l'après H5N1. *TeMA*, **7** : 38-41.

BROWN J.D., SWAYNE D.E., COOPER R.J., BURNS R.E., STALLKNECHT D.E., 2006. Persistence of H5 and H7 avian Influenza viruses in water. *Avian Diseases*, **51** : 285–289.

BÜRGMAYR S., GRABHER-MEIER H., STAUDACHER E., 2001. Sialic acids in gastropods. *FEBS Letters*, **508** : 95-98.

BURGOS S., OTTE, M J., PFEIFFER D., METRAS R., KASEMSUWAN S., CHANACHAI K., HEFT-NEAL S., ROLAND-HOLST D., 2008. Poultry, HPAI and livelihoods in Thailand - A Review. *Mekong Team Working Paper*, **4** : 46 p.

CARLSSON N.O.L., BRONMARK C., HANSSON L.A., 2004. Invading herbivory: the golden apple snail alters ecosystem functioning in asian wetlands. *Ecology*, **85** (6) : 1575-1580.

CHEN W., HE B., LI C., ZHANG X., WU W., YIN X, FAN B., FAN X., WANG J., 2007. Real-time RT-PCR for H5N1 avian influenza A virus detection. *Journal of Medical Microbiology*, **56** : 603–607.

CHOBCHUENCHOM W., BHUMIRATANA A., 2003. Isolation and characterization of pathogens attacking *Pomacea canaliculata*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, **19** : 903-906.

CHUMPOLBANCHORN K., SUEMANOTHAM N., SIRIPARA N., PUYATI B., CHAICHOUNE K., 2006. The effect of temperature and UV light on infectivity of avian influenza virus (H5N1, thai field strain) in chicken fecal manure. *Southeast Asian journal of tropical medicine and public health*, **37** (1) : 102-105.

COWIE R.H., 2006. Apple snails (Ampullariidae) as agricultural pests: their biology, impacts and management. *In* : Molluscs as crop pests, ed. G.M. Barker, CABI Publishing, Wallingford. p. 145-192

ESTEBENET A.L., MARTÍN P.R., 2002. *Pomacea canaliculata* (Gastropoda: Ampullariidae): life history traits and their plasticity. *Biocell.*, **26** (1) : 83-89.

GILBERT M., CHAITAWEESUB P., PARAKAMAWONGSA T., PREMASHTHIRA S., TIENSIN T., KALPRAVIDH W., WAGNER H., SLINGENBERGH J., 2006. Free-grazing ducks and highly pathogenic avian influenza, Thailand. *Emerg. Infect. Dis.*, **12** (2) : 227-34.

GILBERT M., XIAO X., CHAITAWEESUB P., KALPRAVIDH W., PREMASHTHIRA S., BOLES S., SLINGENBERGH J., 2007. Avian influenza, domestic ducks and rice agriculture in Thailand. *Agric. Ecosyst. Environ.*, **119** : 409–415.

HORIMOTO T., KAWAOKA Y., 2006. Strategies for developing vaccines against H5N1 influenza A viruses. *Trends in Molecular Medicine*, **12** (11) : 506-514.

HORIMOTO T., MURAKAMI S., MURAMOTO Y., YAMADA S., FUJII K., KISO M., IWATSUKI-HORIMOTO K., KINO Y., KAWAOKA Y., 2007. Enhanced growth of seed viruses for H5N1 influenza vaccines. *Virology*, **366** (1): 23-27.

ICHINOSE K., WADA T., YUSA Y., KUBOTA T., 2000. Influence of habitat differences brought about by environmental changes on the densities of adults and eggs of *Pomacea canaliculata*. *Proceedings of the Association for Plant Protection of Kyushu*, **46** : 78–84

ITO T., OKAZAKI K., KAWAOKA Y., TAKADA A., WEBSTER R.G. KIDA H., 1995. Perpetuation of influenza A viruses in Alaskan waterfowl reservoirs. *Arch Virol.* **140** (7) : 1163-1172.

JOSHI R.C., 2005. Managing invasive alien mollusc species in rice. *International Rice Research Notes*, **30** (2) : 5-13.

JOSHI R.C., 2007. Problems with the management of the golden apple snail *Pomacea canaliculata*: an important exotic pest of rice in Asia. *Area-Wide Control of Insect Pests*, 792 p., 257-264.

KENJI I., 2003. Expansion of the golden apple snail, *Pomacea canaliculata*, and features of its habitat. <http://www.agnet.org/library/eb/540/>

KOMALAMISRA C., NUAMTANONG S., DEKUMYOY P., 2009. *Pila ampullacea* and *Pomacea canaliculata*, as new paratenic hosts of *Gnathostoma spinigerum*. *Southeast Asian journal of tropical medicine and public health*, **40** (2) : 243-246.

LOUISIROATCHANAKUL S., LERDSAMRAN H., WIRIYARAT W., SANGSIRIWUT K., CHAICHOUNE K., POORUK P., SONGSERM T., KITPHATI R., SAWANPANYALERT P., KOMOLTRI C., AUEWARAKUL P., PUTHAVATHANA P., 2007. Erythrocyte Binding Preference of Avian Influenza H5N1 Viruses. *Journal of Clinical Microbiology*, **45** (7) : 2284–2286.

MANUAL OF AVIAN INFLUENZA DIAGNOSTIC TECHNIQUES, 2006. Training workshop on diagnostic laboratory techniques for avian influenza. Australian animal health laboratory 9th – 20th October, 2006.

MANUEL TERRESTRE DE L'OIE, 2005. Chapitre 2. 1. 14. Influenza aviaire. p. 290-305.

POTIMA, M., 2007. Comparative assessment of avian influenza virus isolation and identification using reverse transcriptase polymerase chain reaction, embryonated eggs and cell culture. Thèse Master vét., Chiang Mai university, Thaïlande and Freie universität Berlin, Allemagne, 73 p.

PRECHEL D.P., CAIN G.D., NOLLEN P.M., 1976. Responses of *Megalodiscus temperatus* miracidia to amino and sialic acids found in snail-conditioned water. *The Journal of Parasitology*, **62** (5) : 693-697.

RIETHMULLER P., CHALERMPAO N., 2002. The livestock industries of Thailand. *Rapport de la FAO*.

SHINYA K., EBINA M., YAMADA S., ONO M., KASAI N., KAWAOKA Y., 2006. Avian flu: Influenza virus receptors in the human airway. *Nature*, **440** : 435-436.

SRI-AROON P., BUTRAPORN P., LIMSOOMBOON J., KERDPUECH Y., KAEWPOOLSRI M., KIATSIRI S., 2005. Freshwater mollusks of medical importance in Kalasin province, northeast Thailand. *Southeast Asian journal of tropical medicine and public health*, **36** (3) : 653-657.

SRI-AROON P., BUTRAPORN P., LIMSOOMBOON J., KAEWPOOLSRI M., CHUSONGSANG Y., CHAROENJAI P., CHUSONGSANG P., NUMNUAN S., KIATSIRI S., 2007. Freshwater mollusks at designated areas in eleven provinces of Thailand according to the water resource development projects. *Southeast Asian journal of tropical medicine and public health*, **38** (2) : 294-301.

STALLKNECHT D.E., BROWN J.D., 2009. Tenacity of avian influenza viruses. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **28** (1) : 59-67.

TANAKA K., WATANABE T., HIGUCHI H., MIYAMOTO K., YUSA Y., KIYONAGA T., KIYOTA H., SUZUKI Y., WADA T., 1999. Density-dependent growth and reproduction of the apple snail, *Pomacea canaliculata*: a density manipulation experiment in a paddy field. *Researches on population ecology*, **41** : 253-262.

TEO S.S., 2004. Biology of the golden apple snail, *Pomacea canaliculata* (Lamarck, 1822), with emphasis on responses to certain environmental conditions in Sabah, Malaysia. *Molluscan Research*, **24** : 139-148.

TEUFEL N., MARKEMANN A., KAUFMANN B., VALLE ZÁRATE A., OTTE J., 2010. Livestock production systems in South Asia and the greater Mekong sub-region : A quantitative description of livestock production in Bangladesh, Cambodia, India, Lao PDR, Nepal, Pakistan, Sri Lanka, Thailand, and Viet Nam. *Pro-Poor Livestock Policy Initiative Working Paper*, **48**.

TISDELL C.A., MURPHY T., KEHREN T., 1997. Characteristics of Thailand's commercial pig and poultry industries, with international comparisons. *World Animal Review*, **89** (2) : 2.

WEBSTER R.G., YAKHNO M., HINSHAW V.S., BEAN W.J., MURTI K.G., 1978. Intestinal influenza: replication and characterization of influenza viruses in ducks. *Virology*, **84** (2) : 268-78.

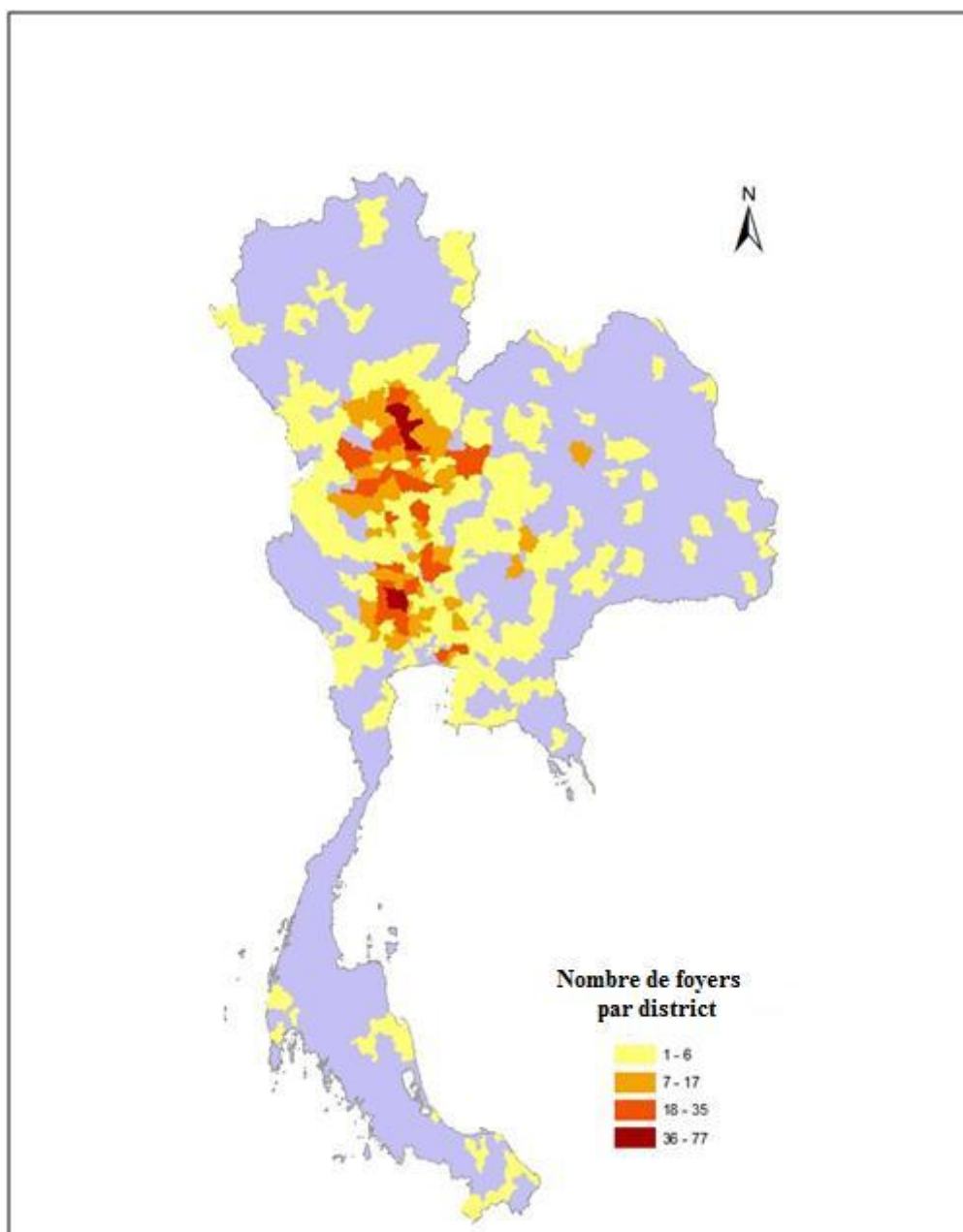
WEINBERG A., METTENBRINK C.J., YE D., YANG C.F., 2005. Sensitivity of diagnostic tests for influenza varies with the circulating strains. *J. Clin. Virol*, 33 (2) : 172-177.

WHO, Guidelines to be used for producing minimum standards for water, sanitation, hygiene and waste management in health-care settings, with specific reference to developing countries, draft under progress.

WORLD HEALTH ORGANIZATION EXPERT COMMITTEE, 1980. A revision of the system of nomenclature for influenza viruses: a WHO Memorandum. *Bulletin of the World Health Organization*, **58** (4) : 585-591.

Annexes

Annexe 1 : Nombre de foyers de H5N1 par district en Thaïlande entre 2004 et 2008 (Burgos *et al.*, 2008).



Annexe 2 : Calendrier d'inoculation des œufs embryonnés pour le 1^{er} passage.

PASSAGE 1											
Date d'inoculation	Œufs	J1	J2	Date d'inoculation	Œufs	J1	J2	Date d'inoculation	Œufs	J1	J2
03/09/2010	B1 0 (1)	✓	✓	08/09/2010	B1 5 (1)	✓	✓	13/09/2010	B1 10 (1)	✓	✓
03/09/2010	B1 0 (2)	✓	✓	08/09/2010	B1 5 (2)	✓	✓	13/09/2010	B1 10 (2)	✓	✓
03/09/2010	B2 0 (1)	✓	✓	08/09/2010	B2 5 (1)	✓	✓	13/09/2010	B2 10 (1)	✓	✓
03/09/2010	B2 0 (2)	✓	✓	08/09/2010	B2 5 (2)	✓	✓	13/09/2010	B2 10 (2)	✓	✓
03/09/2010	B3 0 (1)	✓	✓	08/09/2010	B3 5 (1)	✓	✓	13/09/2010	B3 10 (1)	✓	✓
03/09/2010	B3 0 (2)	✓	✓	08/09/2010	B3 5 (2)	✓	✓	13/09/2010	B3 10 (2)	✓	✓
03/09/2010	B2 1 (1)	✓	✓	08/09/2010	B4 5 (1)	✓	✓	13/09/2010	B4 10 (1)	✓	✓
03/09/2010	B4 1 (2)	✓	✓	08/09/2010	B4 5 (2)	✓	✓	13/09/2010	B4 10 (2)	✓	✓
03/09/2010	B4 0 (1)	✓	✓	08/09/2010	E011 (1)	✓	✓	14/09/2010	B1 11 (1)	✓	✓
04/09/2010	B1 1 (1)	✓	✓	08/09/2010	E011 (2)	✓	✓	14/09/2010	B1 11 (2)	✓	✓
04/09/2010	B1 1 (2)	✓	✓	08/09/2010	E012 (1)	✓	✓	14/09/2010	B2 11 (1)	✓	✓
04/09/2010	B2 1 (1)	✓	✓	08/09/2010	E012 (2)	✓	✓	14/09/2010	B2 11 (2)	✓	✓
04/09/2010	B2 1 (2)	✓	✓	08/09/2010	E013 (1)	✓	✓	14/09/2010	B3 11 (1)	✓	✓
04/09/2010	B3 1 (1)	✓	✓	08/09/2010	E013 (2)	✓	✓	14/09/2010	B3 11 (2)	✓	✓
04/09/2010	B3 1 (2)	✓	✓	08/09/2010	E014 (1)	✓	✓	14/09/2010	B4 11 (1)	✓	✓
04/09/2010	B4 1 (1)	✓	✓	08/09/2010	E014 (2)	✓	✓	14/09/2010	B4 11 (2)	✓	✓
04/09/2010	B4 1 (2)	✓	✓	08/09/2010	E015 (1)	✓	✓	14/09/2010	E026 (1)	✓	✓
04/09/2010	E001 (1)	✓	✓	08/09/2010	E015 (2)	✓	✓	14/09/2010	E026 (2)	✓	✓
04/09/2010	E001 (2)	✓	✓	09/09/2010	B1 6 (1)	✓	✓	14/09/2010	E027 (1)	✓	✓
04/09/2010	E002 (1)	✓	✓	09/09/2010	B1 6 (2)	✓	✓	14/09/2010	E027 (2)	✓	✓
04/09/2010	E002 (2)	✓	✓	09/09/2010	B2 6 (1)	✓	✓	14/09/2010	E028 (1)	✓	✓
04/09/2010	E003 (1)	✓	✓	09/09/2010	B2 6 (2)	✓	✓	14/09/2010	E028 (2)	✓	✓
04/09/2010	E003 (2)	✓	✓	09/09/2010	B3 6 (1)	✓	✓	14/09/2010	E029 (1)	✓	✓
04/09/2010	E004 (1)	✓	✓	09/09/2010	B3 6 (2)	✓	✓	14/09/2010	E029 (2)	✓	✓
04/09/2010	E004 (2)	✓	✓	09/09/2010	B4 6 (1)	✓	✓	14/09/2010	E030 (1)	✓	✓
04/09/2010	E005 (1)	✓	✓	09/09/2010	B4 6 (2)	✓	✓	14/09/2010	E030 (2)	✓	✓
04/09/2010	E005 (2)	✓	✓	10/09/2010	B1 7 (1)	✓	✓	15/09/2010	B1 12 (1)	✓	✓
05/09/2010	B1 2 (1)	✓	✓	10/09/2010	B1 7 (2)	✓	✓	15/09/2010	B1 12 (2)	✓	✓
05/09/2010	B1 2 (2)	✓	✓	10/09/2010	B2 7 (1)	✓	✓	15/09/2010	B2 12 (1)	✓	✓
05/09/2010	B2 2 (1)	✓	✓	10/09/2010	B2 7 (2)	✓	✓	15/09/2010	B2 12 (2)	✓	✓
05/09/2010	B2 2 (2)	✓	✓	10/09/2010	B3 7 (1)	✓	✓	15/09/2010	B3 12 (1)	✓	✓
05/09/2010	B3 2 (1)	✓	✓	10/09/2010	B3 7 (2)	✓	✓	15/09/2010	B3 12 (2)	✓	✓
05/09/2010	B3 2 (2)	✓	✓	10/09/2010	B4 7 (1)	✓	✓	15/09/2010	B4 12 (1)	✓	✓
05/09/2010	B4 2 (1)	✓	✓	10/09/2010	B4 7 (2)	✓	✓	15/09/2010	B4 12 (2)	✓	✓
05/09/2010	B4 2 (2)	✓	✓	10/09/2010	E016 (1)	✓	✓	16/09/2010	B1 13 (1)	✓	✓
06/09/2010	B1 3 (1)	✓	✓	10/09/2010	E016 (2)	✓	✓	16/09/2010	B1 13 (2)	✓	✓
06/09/2010	B1 3 (2)	✓	✓	10/09/2010	E017 (1)	✓	✓	16/09/2010	B2 13 (1)	✓	✓
06/09/2010	B2 3 (1)	✓	✓	10/09/2010	E017 (2)	✓	✓	16/09/2010	B2 13 (2)	✓	✓
06/09/2010	B2 3 (2)	✓	✓	10/09/2010	E018 (1)	✓	✓	16/09/2010	B3 13 (1)	✓	✓
06/09/2010	B3 3 (1)	✓	✓	10/09/2010	E018 (2)	✓	✓	16/09/2010	B3 13 (2)	✓	✓
06/09/2010	B3 3 (2)	✓	✓	10/09/2010	E019 (1)	✓	✓	16/09/2010	B4 13 (1)	✓	✓
06/09/2010	B4 3 (1)	✓	✓	10/09/2010	E019 (2)	✓	✓	16/09/2010	B4 13 (2)	✓	✓
06/09/2010	B4 3 (2)	✓	✓	10/09/2010	E020 (1)	✓	✓	16/09/2010	E031 (1)	✓	✓
06/09/2010	E006 (1)	✓	✓	10/09/2010	E020 (2)	✓	✓	16/09/2010	E031 (2)	✓	✓
06/09/2010	E006 (2)	✓	✓	11/09/2010	B1 8 (1)	✓	✓	16/09/2010	E032 (1)	✓	✓
06/09/2010	E007 (1)	✓	✓	11/09/2010	B1 8 (2)	✓	✓	16/09/2010	E032 (2)	✓	✓
06/09/2010	E007 (2)	✓	✓	11/09/2010	B2 8 (1)	✓	✓	16/09/2010	E033 (1)	✓	✓
06/09/2010	E008 (1)	✓	✓	11/09/2010	B2 8 (2)	✓	✓	16/09/2010	E033 (2)	✓	✓
06/09/2010	E008 (2)	✓	✓	11/09/2010	B3 8 (1)	✓	✓	16/09/2010	E034 (1)	✓	✓
06/09/2010	E009 (1)	✓	✓	11/09/2010	B3 8 (2)	✓	✓	16/09/2010	E034 (2)	✓	✓
06/09/2010	E009 (2)	✓	✓	11/09/2010	B4 8 (1)	✓	✓	16/09/2010	E035 (1)	✓	✓
06/09/2010	E010 (1)	✓	✓	11/09/2010	B4 8 (2)	✓	✓	16/09/2010	E035 (2)	✓	✓
06/09/2010	E010 (2)	✓	✓	12/09/2010	B1 9 (1)	✓	✓	17/09/2010	B1 14 (1)	✓	✓
07/09/2010	B1 4 (1)	✓	✓	12/09/2010	B1 9 (2)	✓	✓	17/09/2010	B1 14 (2)	✓	✓
07/09/2010	B1 4 (2)	✓	✓	12/09/2010	B2 9 (1)	✓	✓	17/09/2010	B2 14 (1)	✓	✓
07/09/2010	B2 4 (1)	✓	✓	12/09/2010	B2 9 (2)	✓	✓	17/09/2010	B2 14 (2)	✓	✓
07/09/2010	B2 4 (2)	✓	✓	12/09/2010	B3 9 (1)	✓	✓	17/09/2010	B3 14 (1)	✓	✓
07/09/2010	B3 4 (1)	✓	✓	12/09/2010	B3 9 (2)	✓	✓	17/09/2010	B3 14 (2)	✓	✓
07/09/2010	B3 4 (2)	✓	✓	12/09/2010	B4 9 (1)	✓	✓	17/09/2010	B4 14 (1)	✓	✓
07/09/2010	B4 4 (1)	✓	✓	12/09/2010	B4 9 (2)	✓	✓	17/09/2010	B4 14 (2)	✓	✓
07/09/2010	B4 4 (2)	✓	✓	12/09/2010	E021 (1)	✓	✓				
				12/09/2010	E021 (2)	✓	✓				
				12/09/2010	E022 (1)	✓	✓				
				12/09/2010	E022 (2)	✓	✓				
				12/09/2010	E023 (1)	✓	✓				
				12/09/2010	E023 (2)	✓	✓				
				12/09/2010	E024 (1)	✓	✓				
				12/09/2010	E024 (2)	✓	✓				
				12/09/2010	E025 (1)	✓	✓				
				12/09/2010	E025 (2)	✓	✓				

Annexe 3 : Protocole d'extraction d'ARN avec le kit NucleoSpinTM RNA Virus

- 100 µL d'échantillon + 50 µL de PBS dans tubes eppendorf
- Ajout de 600 µL de Lysis Buffer, mixer et conserver 5 min à température ambiante.
- Ajout de 600 µL d'éthanol pur, mixer et transvaser le contenu dans les tubes collecteurs.
- Centrifuger 1 min à 25°C et 13000 rpm
- Transvaser le contenu des tubes eppendorf une 2^e fois dans les tubes collecteurs et refaire une centrifugation.
- Ajout de 500 µL de Buffer 1 et centrifuger 1 min à 25°C et 13000 rpm. Changer de tubes collecteurs.
- Ajout de 600 µL de Buffer 2 et centrifuger 1 min à 25°C et 13000 rpm. Changer de tubes collecteurs.
- Centrifuger 3 min à 25°C et 13000 rpm et remplacer les tubes collecteurs par les tubes eppendorf.
- Ajout de 50 µL de RNase free H₂O et laisser reposer 2 min.
- Centrifuger 1 min à 25°C et 13000 rpm.